

Versuche zum Verständnis der Regulation
der mitochondrialen Genexpression bei der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

Gerhard Rödel

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0076

Versuche zum Verständnis der Regulation der mitochondrialen

Genexpression bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Gerhard Rödel
aus Augsburg

Oktober 1980

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. J. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1980



Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A)	<u>Einleitung</u>	1 - 5
B)	<u>Material und Methoden</u>	6 - 23
1.	Stämme	6 - 7
2.	Medien	7 - 9
3.	Chemikalien und Bezugsquellen	9 - 10
4.	Radiochemikalien	10
5.	Methoden	10 - 23
5.1.	Präparation von Hefemitochondrien	10 - 11
5.1.1.	Nachreinigen der Mitochondrien	11 - 12
5.1.2.	Subfraktionierung von Mitochondrien	12 - 13
5.2.	Präparation mitochondrialer DNS	13 - 14
5.3.	Isolation mitochondrialer RNS	14
5.4.	Proteinbestimmung	14
5.5.	Elektrophoretische Methoden	15 - 16
5.5.1.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten	15
5.5.2.	RNS-Gelelektrophorese	15
5.5.3.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Gelen	16
5.6.	Radioaktive Markierung	17 - 18
5.6.1.	Radioaktive Markierung mitochondrialer Proteine in vivo	17 - 18
5.6.1.1.	unter aeroben Bedingungen	17
5.6.1.2.	unter anaeroben Bedingungen	17 - 18
5.6.2.	Radioaktive Markierung mitochondrialer Nucleinsäuren	18
5.7.	Bestimmung der cAMP-Bindung	18 - 19
5.7.1.	Gleichgewichtsdialyse	18
5.7.2.	Celluloseester-Filter-Bindungstest	19
5.8.	Bestimmung der Radioaktivität	19
5.9.	Immunologische Tests	19 - 20
5.10.	DNS-Filter	20 - 21
5.10.1.	Herstellung	20
5.10.2.	DNS/RNS-Hybridisierung	20 - 21
5.10.3.	Bindung von DNS/Protein-Komplexen auf NC-Filter	21

5.11.	Chromatographie an DNS-Cellulose	21 - 22
5.11.1.	Herstellung von DNS-Cellulose	21 - 22
5.11.2.	Säulenchromatographie an DNS-Cellulose	22
5.12.	Jodierung von Proteinen	22
5.13.	Restriktion von mitDNS	22 - 23
5.14.	Photoaffinity Label	23
5.15.	Weitere Methoden	23
C)	<u>Ergebnisse</u>	24 - 85
1.	Die Rolle von cAMP bei der Regulation von Hefemitochondrien	24 - 63
1.1.	Subzelluläre Lokalisierung der cAMP-Bindung bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.1.1.	cAMP-Bindung in Mitochondrien	26 - 28
1.1.2.	Lokalisierung der cAMP-bindenden Komponente innerhalb der Mitochondrien	28 - 30
1.2.	Charakterisierung der cAMP-bindenden Komponente aus Hefemitochondrien	30 - 42
1.2.1.	Wahl eines geeigneten Detergenz	30
1.2.2.	Einfluß des pH-Wertes	30 - 31
1.2.3.	Optimierung der Waschbedingungen	31 - 32
1.2.4.	cAMP-Bindung als Funktion der Zeit	32
1.2.5.	Spezifität der cAMP-Bindung	34
1.2.6.	Beeinflussung der cAMP-Bindung durch Ionen	35
1.2.7.	Einfluß von Hämin auf die cAMP-Bindung	36
1.2.8.	Bindungskonstante und Zahl der Bindungsstellen	36 - 38
1.2.9.	Photoaffinity Label	38 - 39
1.2.10.	Ort der Synthese des cAMP-bindenden Proteins aus Mitochondrien	40 - 42
1.3.	Anreicherung der cAMP-bindenden Komponente	42 - 44
1.3.1.	cAMP-Sepharose	42
1.3.2.	cAMP-Agarose	42 - 44
1.4.	Versuche zur biologischen Funktion des cAMP-bindenden Systems aus Hefemitochondrien	44 - 51
1.4.1.	Einfluß der Glucoserepression auf das mitochondriale cAMP-bindende System	45 - 47

1.4.2.	Einfluß von cAMP auf die mitochondriale RNS-Synthese	47 - 49
1.4.2.1.	Selektivität der cAMP-stimulierten mitochondrialen Transcription	50 - 51
1.5.	Zusammenhang zwischen DNS- und cAMP-Bindung	51 - 63
1.5.1.	DNS-Cellulose-Säulenchromatographie	51 - 53
1.5.2.	Hydroxylapatit-Säulenchromatographie	53 - 54
1.5.3.	Nitrocellulose- Filter-Assay	55 - 57
1.5.4.	DNS-Cellulose-Chromatographie in Gegenwart und Abwesenheit von cAMP	57 - 61
1.5.5.	Spezifität der Bindung von cAMP/Protein-Komplexen an mitDNS	62 - 63
2.	DNS-bindende mitochondriale Translationsprodukte	63 - 76
2.1.	Nachweismethoden	64
2.2.	DNS-bindende mitochondriale Translationsprodukte aus anaerob gewachsenen Zellen	65
2.3.	Prüfung der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte auf Sequenzspezifität	66 - 67
2.4.	Bindet Subunit III der Cytochromoxidase an mitDNS ?	68 - 76
2.4.1.	Coelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel	68
2.4.2.	SDS-Gelelektrophorese nach partieller Proteolyse	68 - 70
2.4.3.	Immunologische Untersuchungen	71 - 73
2.4.4.	Weitere DNS-bindende mitochondriale Translationsprodukte	73
2.4.5.	cAMP-Stimulierbarkeit der Bindung mitochondrialer Translationsprodukte an mitDNS und Prüfung der Sequenzspezifität der Stimulation	74 - 75
2.4.6.	Wird die Bindung von su III der Cytochromoxidase an DNS durch cAMP beeinflusst ?	75 - 76
3.	Fungieren mitochondriale Translationsprodukte als Signale außerhalb der Mitochondrien ?	76 - 85
3.1.	Lassen sich mitochondriale Translationsprodukte in isolierten Kerner nachweisen ?	76 - 81

3.2.	Lassen sich mitochondriale Trans- lationsprodukte in der Zellmembran nachweisen ?	81 - 85
D)	<u>Diskussion und Ausblick</u>	86 - 95
E)	<u>Zusammenfassung</u>	96 - 97
F)	Verzeichnis der verwendeten Literatur	98 - 117

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ALA	Delta-Aminolävulinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
Brij 58	Polyäthylenglykolmonostearyläther
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CAP	Chloramphenicol
CE	Celluloseester
cGMP	cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
Chloramin T	N-Chlor-p-toluolsulfonamid
CHX	Cycloheximid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Dalton
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
kd	kiloDalton
mitDNS/mitRNS	mitochondriale DNS/RNS
MOPS	Morpholinopropansulfonat
NC	Nitrocellulose
nucDNS	nucleäre DNS
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPD	2(4'-t-Butylphenyl)-5-(4''-biphenyl)- 1,3,4-oxadiazol
RNS	Ribonucleinsäure
r-RNS	ribosomale RNS
SDS	Natriumlaurylsulfat
su	subunit/Untereinheit
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
Triton X-100	Cetylphenoxypolyethoxyäthanol
t-RNS	Transfer-RNS
U	Enzymeinheit (für Restriktionsenzyme die Enzymmenge, die 1 µg λ-DNS bei 37 °C in 1 Stunde vollständig schneidet)

A) Einleitung

Die Biogenese von funktionsfähigen Mitochondrien erfordert das Zusammenwirken zweier verschiedener genetischer Systeme, einmal des cytoplasmatischen unter Kontrolle des Zellkerns, zum anderen des mitochondrialen, das im Organell selbst lokalisiert ist (s. z.B. Schatz & Mason, 1974; Tzagoloff et al., 1973). Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine werden extra-mitochondrial an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet. Nur etwa 5 - 10 % liefert das mitochondriale Translationssystem (Schweyen & Kaudewitz, 1970). Bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae konnten bislang 3 (I - III) der 7 Untereinheiten der Cytochrom-c-oxidase (MG: 40, 33.5, 23 kd), 2 der 10 Untereinheiten der ATPase (MG: 22, 7.5 kd), das Apoprotein des Cytochrom b (MG: 30 kd) sowie das in stöchiometrischen Mengen mit der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen assoziierte VAR 1-Protein (MG: 40 - 44 kd) als mitochondriale Translationsprodukte nachgewiesen werden (Reviews: Schatz & Mason, 1974; Borst & Grivell, 1978; Groot et al., 1979). Mit Ausnahme des letzteren handelt es sich um hydrophobe Proteine der inneren Mitochondrienmembran, die zusammen mit cytoplasmatisch synthetisierten Proteinen strukturelle und/oder funktionelle Bestandteile der Atmungskette darstellen. Für Apocytochrom b (Claisse et al., 1977; Haid et al., 1979), für su IX der ATPase (Hensgens et al., 1979; Macino et al., 1979) sowie für su I, II und III der Cytochromoxidase (Moorman et al., 1978; Eccelshall et al., 1978; Fox, 1979; Cabral et al., 1978) konnte mittlerweile eine Codierung auf der mitDNS nachgewiesen werden.

Die Dualität der Herkunft mitochondrialer Proteine erfordert eine Koordination der Syntheseleistungen der beteiligten Systeme. Die Isolation von Kernmutanten, die zu spezifischen Ausfällen jeweils einer mitochondrial synthetisierten Komponente des Cytochromoxidase- bzw. ATPase-Komplexes führen (Ebner et al., 1973; Tzagoloff et al., 1975), demonstriert, daß die mitochondriale Genexpression zumindest teilweise unter der Kontrolle des nucleären Systems steht. Völlig unbekannt ist allerdings die molekulare Basis einer möglichen Regulation,

also die Frage nach der Natur des Signals, das den Mitochondrien vom Kern zugeleitet wird und nach der Art der Signalerkennung in den Mitochondrien. Weitgehend offen ist auch die Frage, welche Rolle mitochondrialen Genprodukten bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression beizumessen ist. Zu denken ist dabei einmal an den Export mitochondrialer Produkte in das nucleocytoplasmatische System, denen regulatorische Funktionen bezüglich der cytoplasmatischen Komponenten der Mitochondrien zukommen könnten, zum anderen an regulatorisch wirksame Produkte, die in den Mitochondrien selbst wirken, also die mitochondriale Genexpression direkt beeinflussen. Für beide Möglichkeiten finden sich in der Literatur Anhaltspunkte: So interpretieren einige Autoren ihre Ergebnisse, denen zufolge die Induktion der Galactose-abbauenden Enzyme (Puglisi & Algeri, 1971), die Katabolitderepression der Enzyme der Atmungskette (Rouslin, 1976) und die Regulation der (kerncodierten) mitochondrialen RNS-Polymerase (Barath & Küntzel, 1972 a) von einem intakten mitochondrialen Translationssystem abhängig sind, dahingehend, daß ein mitochondrial synthetisierter Repressor in die nucleäre Genexpression eingreift. Ein erstes Beispiel für ein mitochondriales Produkt, dem bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression eine Rolle zukommt, wird durch neue Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Slonimski geliefert, die auf die Existenz eines mitochondrial codierten und synthetisierten Proteins ("Maturase") hindeuten, das beim "splicen" der Precursor-RNS aus der für Apocytochrom b codierenden "cob"-Region beteiligt ist (Jacq et al., 1980).

Faßt man das oben Stehende zusammen, so bleibt festzuhalten, daß es zwar zahlreiche Hinweise auf eine Regulation der mitochondrialen Genexpression gibt, deren Modus aber bis heute noch immer weitgehend unverstanden ist.

Da sich in letzter Zeit zusehends zeigt, daß die Schwerpunkte der Regulation der Genexpression bei Pro- und Eukaryonten unterschiedlich akzentuiert sind, ist es im Fall der Mitochondrien von besonderem Interesse, zu prüfen, ob in diesem System die Regulation eher pro- als eukaryontischen

Systemen ähnelt oder möglicherweise Elemente von beiden in sich trägt. Transcriptionskontrolle, wie sie von Jacob und Monod (1961) auf Grund von Untersuchungen am Lactose-abbauenden System bei *E.coli* postuliert und später bei diesem und anderen prokaryontischen Systemen vielfach bestätigt wurde (z.B. de Crombrughe et al., 1971), findet sich zwar auch bei Eukaryonten (z.B. Zitomer et al., 1979; Bach et al., 1979), spielt aber dort offenbar eine untergeordnete Rolle. Auf Grund der im Vergleich zu Prokaryonten längeren Halbwertszeiten der mRNA scheint bei Eukaryonten die Regulation bevorzugt post-transcriptional anzugreifen, z.B. auf der Ebene der Maturierung von mRNA ("splicing") (Crick, 1979) oder der Translation (Datta et al., 1978; Gross, 1979), ferner durch post-translatorische Veränderungen von Proteinen bei der Anheftung prosthetischer Gruppen oder beim Transport durch bzw. bei der Integration in Membranen (z.B. Schatz, 1980; Hennig et al., 1980; Böhni et al., 1980).

Für das mitochondriale System erscheinen beide Regulations-systeme sinnvoll. Einmal ist bekannt, daß Mitochondrien in ihren Syntheseleistungen rasch auf Änderungen der Umwelt (C-Quelle) reagieren (Perlman & Mahler, 1974). Sie könnten also in regulatorischer Hinsicht bakteriellen Systemen ähneln, die ebenfalls rasch auf Umweltveränderungen reagieren müssen. Es scheint daher angebracht, nach Parallelen im Regulationsmodus zu suchen und zu prüfen, ob in Mitochondrien eine Transcriptionskontrolle vorliegt. Andererseits finden sich mit der Existenz von "split genes" (z.B. Haid et al., 1979) und "splicing"-Prozessen an rNS-Präkursoren (Grivell et al., 1980) sowie von posttranslatorischen Veränderungen von Proteinen (z.B. Machleidt & Werner, 1980) durchaus eukaryontische Charakteristika im mitochondrialen System.

Für experimentelle Arbeiten auf dem Gebiet der Regulation der mitochondrialen Genexpression bietet sich wie bereits angedeutet die "Katabolitrepession" und deren Umkehrung, die De-repression, als das phänotypisch am besten untersuchte und experimentell am leichtesten zugängliche Regulationsphänomen an. In zahlreichen Arbeiten wird das An- und Abschalten verschiedener Enzymsysteme in Abhängigkeit von der vorliegenden

Konzentration an vergärbaren Substraten, deren wirksamstes Glucose ist, beschrieben (Jayaraman et al., 1966; Bløeg et al., 1972; Perlman & Mahler, 1974; Polakis et al., 1965; Holzer, 1976). Rein spekulativ blieb bislang die Beantwortung der Frage, wie dem mitochondrialen System die Information über die jeweilige Stoffwechselsituation zugeleitet wird, also die Frage nach dem Signal und dem molekularen Rezeptor. Da Glucose selbst mit Sicherheit kein Signalcharakter zukommt (sie permeiert nicht in Mitochondrien), ist dabei an ein direktes oder indirektes Folgeprodukt zu denken, in erster Linie an cAMP, das ja im gut untersuchten bakteriellen System die Funktion eines "second messenger" besitzt (Review: Pastan & Adhya, 1976). Es sollte also geprüft werden, ob cAMP, dessen Konzentration ähnlich wie bei E.coli in Hefezellen von der jeweiligen C-Quelle beeinflusst wird (Van Wijk & Konijn, 1971), einen Einfluß auf mitochondriale Funktionen besitzt. Im positiven Fall gilt es dann, den Signalrezeptor (hier: cAMP-erkennendes System) nachzuweisen und zu charakterisieren. Im Hinblick auf eine etwaige Transcriptionskontrolle erscheint es von Interesse, DNS-bindende Proteine auf ihre Befähigung, mit cAMP zu interagieren, zu untersuchen. Welche Rolle mitochondrial synthetisierte Produkte bei der Katabolitrepression/derepression spielen, ist ebenfalls völlig unklar. Hierzu finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben, einerseits solche, die ausschließlich dem System Kern/Cytoplasma regulatorische Funktionen zuschreiben (Tzagoloff et al., 1979), andererseits solche, die mitochondrialen Genprodukten eine entscheidende Rolle zuschreiben (Rouslin, 1976; Barath & Küntzel, 1972 a + b). Rouslin postuliert einen oder mehrere mitochondrial synthetisierte Repressoren, die im Kern und in den Mitochondrien wirken. In diesem Zusammenhang ist der Befund interessant, daß mitochondriale Translationsprodukte an DNS binden und daß die Menge dieser Proteine mit dem Grad der Glucoserepression variiert (Rödel, 1977 a + b).

Ausgehend von der Überlegung, daß in einer Situation wie z.B. der Glucoserepression/derepression eine Koordination der Syntheseleistungen des nucleocytoplasmatischen und des mitochon-

drialen Systems bestehen muß, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit Folgendes untersucht werden:

1) Fungiert cAMP als Signal in den Mitochondrien? Im einzelnen soll untersucht werden, ob es in Mitochondrien ein Erkennungssystem für cAMP gibt und ob cAMP mitochondriale Funktionen beeinflusst. Vor allem interessiert dabei die Frage, ob cAMP mit DNS-bindenden Proteinen interagiert und so direkt die mitochondriale Transcription beeinflussen könnte.

2) Ausgehend vom Postulat eines mitochondrial synthetisierten Repressors (Rouslin, 1976) und der Beobachtung, daß es mitochondriale Translationsprodukte mit DNS-bindenden Eigenschaften gibt (Rödel, 1977 a + b), sollen folgende Fragestellungen geprüft werden:

a) Handelt es sich bei dieser DNS-Bindung um eine statistische, sequenzunspezifische oder um eine sequenzspezifische, könnte sie also regulatorische Bedeutung haben ?

b) Handelt es sich bei diesen Proteinen um bekannte mitochondriale Translationsprodukte oder um bislang nicht identifizierte ? Da die hauptsächlich bindende Komponente mit etwa 24 kd das gleiche Molekulargewicht besitzt wie su III der Cytochromoxidase (Rödel, 1977 a + b), liegt der Hauptaugenmerk auf der Frage der Identität/Nicht-Identität der bindenden Komponente mit dieser su.

c) Kommt mitochondrial synthetisierten Proteinen im Partnersystem Kern/Cytoplasma eine Signalfunktion bei der Regulation der mitochondrialen Biogenese zu ? Wie bereits erwähnt, fordern einige Autoren die Existenz eines mitochondrial synthetisierten Repressors im Kern (Rouslin, 1976; Barath & Küntzel, 1972 a + b; Puglisi & Algeri, 1971; Beauchamp & Gross, 1976). Es gilt also, dieses Postulat experimentell zu prüfen und Kernproteine auf das Vorhandensein mitochondrialer Translationsprodukte zu analysieren.

B) Material und Methoden

1) Stämme

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Stämme der Hefe Saccharomyces cerevisiae sind in Tab. 1 aufgeführt. Sie wurden von Dr. Schweyen, Herrn Schnittchen sowie von Herrn Guba zur Verfügung gestellt.

Zur Nomenklatur:

<u>rho</u> ⁰	Vollständiger Verlust der mitDNS
<u>rho</u> ⁻	Makrodeletionen der mitDNS, die zum Ausfall der mitochondrialen Proteinbiosynthese und damit aller Funktionen, an denen mitochondriale Translationsprodukte beteiligt sind, führen.
<u>rho</u> ⁺	Intakte mitDNS ohne nachweisbare mutative Veränderung
<u>mit</u> ⁻	Durch Punktmutationen oder Minideletionen der mitDNS kommt es bei diesen Stämmen, deren mitochondriales Translationssystem funktionsfähig ist, zu Ausfällen einzelner mitochondrialer Funktionen. Als Folge verlieren die Zellen die Befähigung, auf nicht-vergärbaren Substraten zu wachsen.
<u>mit</u> ⁺	Kennzeichnung des Wildtyp-Allels, das in den entsprechenden mit ⁻ -Stämmen mutativ verändert ist.

Tab. 1: Verzeichnis der verwendeten Stämme

Stamm	mitochondrialer Genotyp	Bemerkung
SM 202 (diploid)	ρ^+ (wt)	
SM 201 (diploid)	ρ^+ , tsm 8 ⁻	isonucleär mit SM 202 Ref.: Handwerker et al., (1973) Bandlow et al., (1977)
ccr-91 (haploid)	ρ^+	Schmitt (1979)
SM 11-6 c (haploid)	ρ^+ (wt)	isogenischer wt zu ccr-91
KL 14-4 A	ρ^0	
A 14	ρ^-	
HD 1	ρ^-	
G 1-11-4	ρ^-	die jeweils noch vorhandene Region der mitDNS ist aus der Genkarte (Abb. 1) zu entnehmen
PM 1 C 6573	ρ^-	
AS 1	ρ^-	
C 45 P 1	ρ^-	
PM 1 H 1261	ρ^-	

2) Medien

YPD-Medium: 1 % Yeastextrakt, 3 % Glucose

YPG-Medium: 1 % Yeastextrakt, 3 % Glycerin

YPGal-Medium: 1 % Yeastextrakt, 3 % Galactose

Die C-Quelle wurde jeweils nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

Bei Festmedien wurde jeweils 1.5 % Agar zugesetzt.

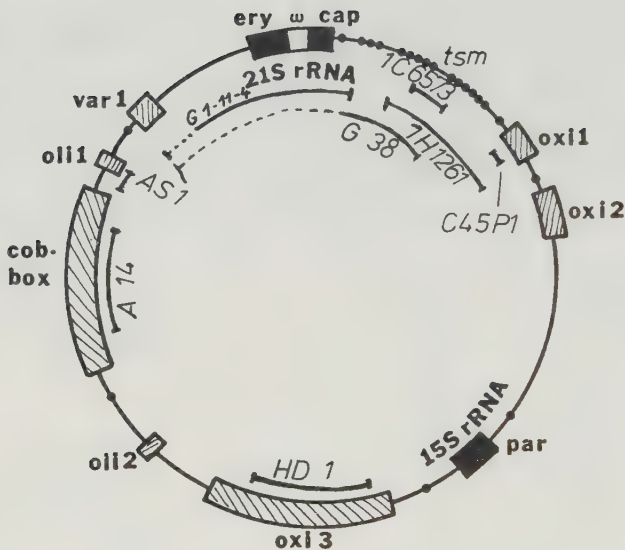


Abb.1: Genkarte der mitDNS von Saccharomyces cerevisiae (modifiziert nach Borst et al., 1977) und Lokalisierung verwendeter rho⁻-Stämme

Die mit der jeweiligen Stammbezeichnung versehenen Segmente zeigen das in diesen Stämmen zurückbehaltene DNS-Fragment an.

cob/box: Gen für Apocytochrom b

oxi 1,2,3: Gene für Cytochromoxidaseuntereinheiten II, III und I

oli 1,2: Gene für die ATPase-Untereinheiten IX, VI

var 1: die Expression des VAR 1-Proteins determinierende Region

tsm: vermutlich im Gen für t-RNS^{Tyr} liegender Marker

par, ery und cap bezeichnen Abschnitte der DNS, in denen Mutationen zur Paromomycin-, Erythromycin- und Chloramphenicolresistenz lokalisiert wurden.

LSM-Medium ("low sulphate medium")

Stammlösungen:

Salze	(NH ₄)H ₂ PO ₄	6.0	%	Spurenelemente	Borsäure	0.05	%
	MgCl ₂	0.19	%		CuSO ₄	0.004	%
	NH ₄ Cl	1.62	%		KJ	0.01	%
	KH ₂ PO ₄	1.0	%		MnSO ₄	0.04	%
	NaCl	0.1	%		Na ₂ MoO ₄	0.02	%
	CaCl ₂	0.1	%		ZnSO ₄	0.04	%

Vitamine	Ca-pantothenat	0.04	%	FeCl ₃ -Lösung:			
	Thiamin-HCl	0.04	%		FeCl ₃	0.02	%
	Pyridoxin	0.04	%	Inositol-Lösung:			
	Nicotinsäure	0.01	%		Meso-Inositol		
	Biotin	0.0004	%			2	%

Zur Herstellung von LSM werden die steril filtrierte Stamm-lösungen wie folgt gemischt:

Salze	90 ml
Spurenelemente	1 ml
Vitamine	5 ml
Inositol-Lösung	1 ml
FeCl ₃ -Lösung	1 ml
H ₂ O dest.	ad 1 l

3) Chemikalien und Bezugsquellen

- CAP (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Instagel (Packard Instruments, Downers Grove, USA)
- Emasol (Kao-Atlas, Tokio)
- BSA (Behring, Marburg)
- Cellex 410 Cellulose (Bio Rad, München)
- Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Amidotrizoesäure; Methylglucamin (Schering, Berlin)

- Sarkosyl NL-35 (Ciba-Geigy, Basel)
- Zymolase (Kirin Brewery Co., Ltd., Takasaki, Japan)
- Häm-in; Dithiothreitol; PPO; POPOP; MOPS (Sigma, St. Louis, USA)
- cAMP-Agarose (P-L Biochemicals, Milwaukee, USA)
- Bisbenzimid (Riedel de Haen, Seelze)
- Acrylamid; Ammoniumpersulfat; CHX; N,N'-Methylenbisacrylamid; Ethidiumbromid; Lubrol; Brij 58; Tween 80; TEMED; Triton X-100; Penicillin; Amberlite XAD-2 (Serva, Heidelberg)
- DNase; 2'-AMP; 3'-AMP; 5'-AMP; 3',5'-cAMP; 3',5'-cGMP; Carboanhydrase; Chymotrypsinogen; Cytochrom c; Ovalbumin (Boehringer, Mannheim)
- Alle anderen Feinchemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen. cAMP-Sepharose wurde freundlicherweise von Dr. Breitenbach, Wien zur Verfügung gestellt.

4) Radiochemikalien

Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten radioaktiven Substanzen ($^{35}\text{SO}_4^{--}$; ^3H / ^{14}C -Adenin; ^3H / ^{14}C -Uridin; $^{125}\text{J}^-$) wurden von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig bezogen.

5) Methoden

5.1. Präparation von Hefemitochondrien

Hefezellen, deren Aufzucht bei guter Belüftung in YPD-, YPG- oder YPGal-Medium erfolgte, werden bei einem Titer von $2-8 \times 10^7$ für 5 min bei 3500 rpm (GSA-Rotor, Sorvall) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit dest. Wasser erfolgte der Zellaufschluß durch Lyse der enzymatisch protoplastierten Zellen wie folgt: Die Zellen werden in 20 mM Tris/ Cl^- pH 7.2
2 mM EDTA
1.5 M Sorbitol
bei 37 °C suspendiert (30 ml/10 g Zellen, Naßgewicht), nach

Zugabe von Mercaptoäthanol (2 ml/30 ml) wird Zymolase zu einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Der Verlauf der enzymatischen Protoplastenbildung wird mikroskopisch verfolgt. Bei einer Protoplastierungsrate von etwa 80 % werden die Zellen abzentrifugiert, in 20 mM Tris/Maleat pH 6.8
2 mM EDTA
0.6 M Sorbitol

suspendiert und mechanisch durch Schütteln mit Glasperlen (ϕ 0.45 - 0.50 mm) per Hand oder mittels Vortexen aufbrochen. Zum letztgenannten sowie allen weiteren Puffern wird PMSF, ein Hemmstoff von Serin-Proteasen (Kalnov et al., 1979) in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt, um dem proteolytischen Abbau mitochondrialer Proteine vorzubeugen. Durch zweimaliges Zentrifugieren (10 min, 2500 rpm und 10 min, 3500 rpm, SS 34-Rotor, Sorvall) werden Glasperlen, ganze Zellen, Membranfragmente und Zellkerne entfernt. Durch Zentrifugation des Überstandes (20 min, 18000 rpm, SS 34-Rotor, Sorvall) erhält man ein Pellet, das Mitochondrien und mitochondriale Fragmente stark angereichert enthält (= "rohe Mitochondrienfraktion"). Nach raschem Einfrieren wurde diese Fraktion bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

Der postmitochondriale Überstand wird durch 12-stündige Zentrifugation bei $100000 \times g$ (50 Ti-Rotor, Beckman) subfraktioniert, das resultierende Pellet ("S-100-Fraktion") enthält vorwiegend cytoplasmatische Ribosomen, während im Überstand (= postribosomaler Überstand) lösliche cytoplasmatische Proteine angereichert werden.

Das nachstehende Schema faßt noch einmal die Subfraktionierungsschritte zusammen (Abb. 2).

5.1.1. Nachreinigen der Mitochondrien

Die rohe Mitochondrienfraktion wurde mittels Zentrifugation im Urographindichtegradienten nachgereinigt. Hierzu wurde das Mitochondrienpellet in 0.6 M Sorbitolpuffer (s. 5.1.) suspendiert (etwa 100 mg/ml) und entweder auf einen linearen Gradienten von 25 bis 60 % Urographin oder auf einen Stufengradienten mit den Stufen 60 %, 45 %, 35 % und 25 % Urographin vorsichtig aufgeschichtet. Nach zweistündiger Zentrifugation mit 27000rpm (SW 27-Rotor, Beckman) wurde die zwischen 35

und 45 % Urographin resultierende Bande entnommen, mit 0.6 M Sorbitolpuffer verdünnt und erneut 20 min mit 18000 rpm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Das resultierende Pellet besteht aus weitgehend intakten, kontaminationsfreien Mitochondrien.

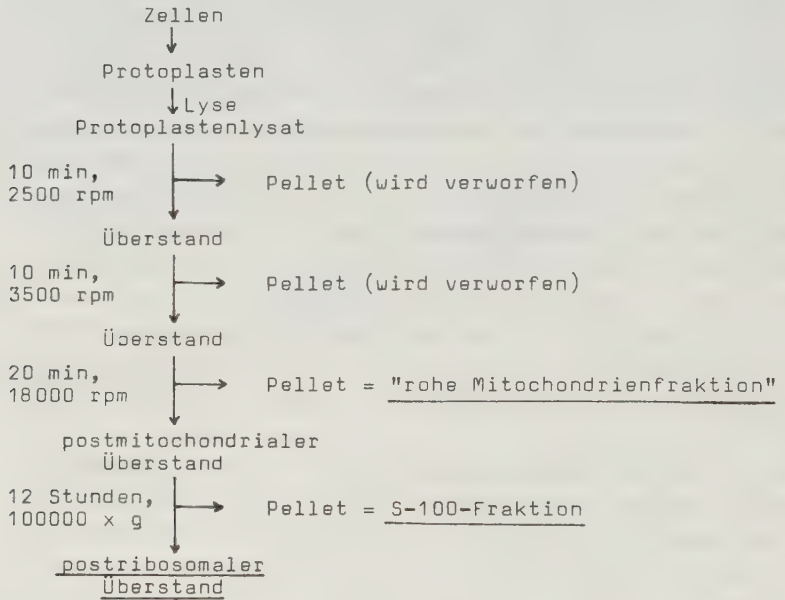


Abb. 2: Schematische Darstellung der Subfraktionierung ganzer Zellen; Einzelheiten siehe Text

5.1.2. Subfraktionierung von Mitochondrien

Hierzu wurde das Mitochondrienpellet in 10 mM Tris/Acetat pH 7.4
60 mM Ammoniumacetat
5 mM Dithiothreitol
suspendiert (etwa 10 mg/ml), nach 10-minütigem Stehenlassen
bei 4 °C sowie mehrmaligem Pottern 15 min bei 10000 rpm (SS 34-

Rotor, Sorvall) abzentrifugiert. Das resultierende Pellet enthält Mitochondrienmembranen stark angereichert. Der Überstand wird (entsprechend dem postmitochondrialen Überstand, s. Abb.2) durch 12-stündige Zentrifugation bei 100000 x g (50 Ti-Rotor, Beckman) in ein Pellet = mitochondriale S-100-Fraktion sowie in einen Überstand, in dem sich die löslichen mitochondrialen Proteine befinden, subfraktioniert.

5.2. Präparation mitochondrialer DNS

Wie unter 5.1. beschrieben isolierte Mitochondrien werden bei 65 °C in folgendem Puffer lysiert:

10 mM Tris/Cl⁻ pH 7.4
150 mM NaCl
10 mM EDTA
1 % SDS (alternativ: 2 % Sarkosyl)

Das nach 15-minütigem Stehen in Eis aufgefallene Detergenz wird abzentrifugiert (15 min, 15000 rpm, SS 34-Rotor, Sorvall), dem Überstand wird Ethidiumbromid (1 µg/ml) oder Bisbenzimid (0.5 µg/ml) zugesetzt, anschließend mit NaJ ein Brechungsindex von 1.4295 (refraktometrische Kontrolle) eingestellt. MitDNS ist nach 48-stündiger Zentrifugation (volumenabhängig: 40000 rpm, Ti 50-Rotor, Beckman/ 38000 rpm, Ti 60-Rotor, Beckman/ 40000 rpm, Vertikalrotor, Sorvall) als oberste der 2 bzw. 3 resultierenden Banden deutlich zu erkennen. Eventuelle Kontamination durch nucDNS bei der Entnahme der Bande durch seitliches Anstechen des Tubes mit einer Kanüle (Ø 1.4 mm) wird durch erneute 48-stündige Zentrifugation abgetrennt. Die schließlich entnommene Fraktion wird zur Entfernung von Bisbenzimid zweimal mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird zur Entfernung von NaJ etwa 36 Stunden lang gegen 4 mal je 2 l TE-Puffer (= 10 mM Tris/Cl⁻ pH 7.2, 1 mM EDTA) sowie weitere 24 Stunden gegen 20 mM Ammoniumacetat pH 7.2/ 0.1 mM EDTA dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Die weitgehend salzfreie DNS wird in wenig TE-Puffer gelöst und zur Beseitigung störender Proteine mit Phenol (pH 7.6; gesättigt mit TE-Puffer) extrahiert. Phenol wird schließlich aus der wäßrigen Phase durch viermalige Ätherextraktion entfernt. Durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat und 3

Volumina Äthanol (96 %) wird die DNS in der Kälte (15 min, - 80 °C) gefällt. Das durch Zentrifugation (10 min, 10000 rpm in silikonisierten Corex-Tubes im SS 34-Rotor, Sorvall) gewonnene DNS-Pellet wird im Exsiccator getrocknet und in einem kleinen Volumen TE-Puffer aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wird von einem Aliquot ein Spektrum von 220 - 300 nm (Gilford-Spektralphotometer 240) angefertigt. Wie bei Cryer (1975) beschrieben, entspricht eine optische Dichte von 1.0 bei 260 nm einem DNS-Gehalt von 50 µg.

5.3. Isolation mitochondrialer RNS

Wie unter 5.1. beschrieben, werden Mitochondrien isoliert und zur Beseitigung von kontaminierender cytoplasmatischer RNS bis zu viermal mit 0.6 M Sorbitolpuffer gewaschen. Die Lyse erfolgte möglichst rasch (maximal 1 min) in folgendem Puffer:

Puffer: 10 mM Tris/Cl⁻ pH 7.2
 2 mM EDTA
 1 % SDS

Zur Reduktion störender RNase-Aktivität wurde Diäthylpyrocabonat zu einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt (Fedorcsák, 1969). Unmittelbar nach der Lyse wurde mit Puffer-gesättigtem Phenol extrahiert, die Äthanolpräzipitation der RNS erfolgte durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumina Äthanol bei - 80 °C.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 5.2. für DNS beschrieben, wobei der Konzentrationsberechnung die Beziehung $OD_{260 \text{ nm}} \cdot 1 = 40 \text{ µg/ml}$ zugrunde gelegt wurde (Rubin, 1975).

5.4. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden normalerweise nach der von Lowry et al. (1951) oder im Schnelltest nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. Beide Bestimmungsmethoden erweisen sich in Gegenwart von Urographin bzw. Tween 80 als untauglich. Der Proteingehalt Urographin-haltiger Lösungen wurde nach Mc Knight (1977) ermittelt.

5.5. Elektrophoretische Methoden

5.5.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente kamen Agarosegele (0.9 - 1.5 %) oder Polyacrylamidgele (5 %) zum Einsatz, jeweils in TE-Puffer, der auch als Elektrophoresepuffer diente. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 30 mA/200 V für 3 - 5 Stunden (Angaben für 2 mm dicke Slabgele der Größe 20 cm x 15 cm). Vor Auftragung werden pro 100 µl Probe 5 µl einer Bromphenolblaulösung in 50 % Glycerin zum Beschweren der Proben und als Frontindikator zugesetzt. Als Molekulargewichtsstandard diente pBR 322-Plasmid-DNS, die, mit Hinf I geschnitten, 10 Fragmente (1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 und 75 bp) liefert (Sutcliffe, 1978). Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele für 15 min mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt und im Durrum Laborator 1200 auf Gevatone Pan P 230 p-Filmen unter UV-Licht (254 nm) bei Vorschalt eines Rotfilters photographiert.

5.5.2. RNS-Gelelektrophorese

MitRNS wurde in Agarose/Harnstoffgelen wie bei Locker et al. (1980) beschrieben aufgetrennt. Zur Vermeidung störender RNase-Aktivität wurden alle Gefäße und Puffer vor Gebrauch autoklaviert.

Gel: Hierzu wurde ein 1 x RNS-Puffer (40 mM Tris/Cl⁻ pH 7.4, 36 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA), dem Harnstoff zu einer Konzentration von 6 M zugesetzt war, nach Zugabe von 1.5 % Agarose aufgekocht und nach Abkühlung zum Gießen der Gele verwendet. Den in TE-Puffer gelösten Proben wird wie bei 5.5.1. beschrieben Bromphenolblau und Glycerin zugesetzt. Als Elektrophoresepuffer diente der oben genannte 1 x RNS-Puffer, die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit etwa 5 V/cm durchgeführt.

Anfärben und Photographieren der Gele wurde wie unter 5.5.1. beschrieben durchgeführt.

5.5.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Gelen

Proteine wurden in SDS/Polyacrylamid-Gelen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Trenngel fungierte entweder ein exponentieller Acrylamidgradient von 10 - 15 % (Douglas & Butow, 1976) oder 10 % Acrylamid, als Sammelgel 6 % Acrylamid. Die Gelapparaturen waren ähnlich den von Studier (1973) beschriebenen, als Puffersystem wurde das von Laemmli (1970) beschriebene, diskontinuierliche Puffersystem verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA (entsprechend 150 - 400 V) durchgeführt.

Als Molekulargewichtsstandard diente eine Probe mit folgenden Proteinen:

Name	Molekulargewicht (kd)
Cytochrom c	12.5
Pferde-Myoglobin	17.8
Chymotrypsinogen A	24.5
Carboanhydrase	29.0
Ovalbumin	45.0
BSA	67.0

Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele 30 min fixiert (10 % TCA, 20 % Methanol), 2 Stunden angefärbt (0.2 % Coomassieblau, 1 % Methanol, 1.3 % Essigsäure) und schließlich solange entfärbt (7 % Essigsäure), bis sich die Proteinbanden klar vom Hintergrund abhoben. Handelte es sich bei den Proben um ³H-markierte Proteine, so erfolgte nun eine Weiterbehandlung der Gele nach Bonner & Laskey (1974), d.h. dreimaliges Inkubieren in 16 % POPOP in DMSO und anschließendem Wässern. Autoradiographie: Die auf Whatman 3 MM-Papier getrockneten Gele wurden bei - 80 °C bis zu mehreren Wochen mit einem Röntgenfilm (Kodak Royal X-Omat XR-5/Kodak Regulix BR-5) exponiert. Bei Proben mit niedriger Radioaktivität wurden Verstärkerfolien (Cawo VI) eingesetzt.

5.6. Radioaktive Markierung

5.6.1. Radioaktive Markierung mitochondrialer Proteine in vivo

5.6.1.1. unter aeroben Bedingungen

Hierbei wurde im wesentlichen nach der Methode von Douglas & Butow (1976) verfahren. Zellen der logarithmischen Wachstumsphase werden zweimal mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen, zu einem Titer von etwa 2×10^8 in LSM + 3 % C-Quelle suspendiert und eine Stunde bei 30°C geschüttelt. 5 min nach Zugabe von CHX (200 $\mu\text{g/ml}$) bzw. von CAP (4 mg/ml) zur Blockierung der Translation an mitochondrialen bzw. cytoplasmatischen Ribosomen (Sisler & Siegel, 1967; Clark-Walker & Linnane, 1966) wird $^{35}\text{SO}_4^{--}$ (bis zu 5 mCi/ 10^{10} Zellen) oder ^3H -Aminosäure-Mix (bis zu 1 mCi/ 10^{10} Zellen) zugesetzt. Nach 60 min wird die Markierung durch Zugabe eines "chase" (=Überschuß an unmarkiertem SO_4^{--} bzw. Aminosäuren) beendet. Zur weiteren Aufarbeitung siehe 5.1.

5.6.1.2. unter anaeroben Bedingungen

Hierbei erfolgte die Züchtung und die radioaktive Markierung in folgender Apparatur (anaerobe Kammer):

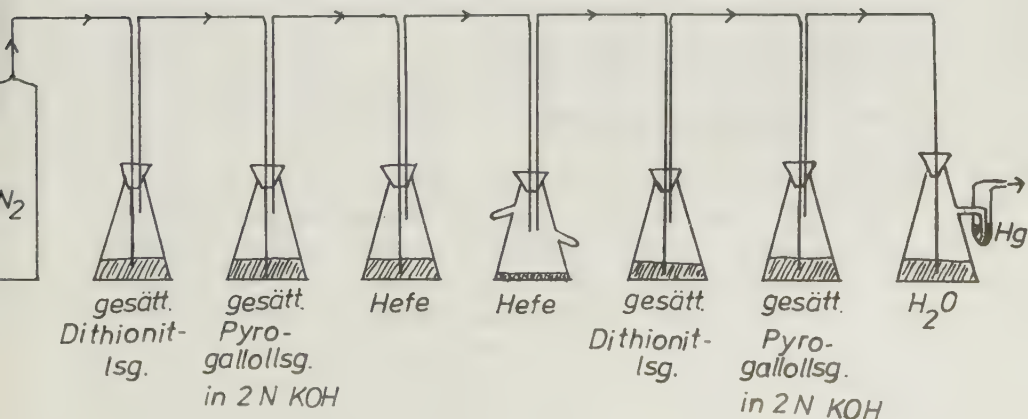


Abb. 3: Apparatur zur anaeroben Züchtung und Markierung von Hefen

CHX sowie $^{35}\text{SO}_4^{--}$ wurden vor Versuchsbeginn in die oben gezeichneten Vorratsgefäße pipettiert und zur entsprechenden Zeit durch vorsichtiges Kippen in die Zellsuspension überführt. Im Unterschied zur aeroben Markierung entfielen hier - bedingt durch die Apparatur - sämtliche Waschschriffe vor der Markierung. Statt dessen wurden die Zellen von vorne herein in LS-Medium, dem neben der C-Quelle (Glucose) auch Tween 80 (2.6 mg/ml) sowie Ergosterol (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt wurden (Schatz & Kováč, 1974). Die Markierung wird durch rasche aerobe Zugabe des "chase" beendet.

5.6.2. Radioaktive Markierung mitochondrialer Nucleinsäuren

Zum Zwecke der Grundmarkierung wurde dem Medium abends beim Animpfen 10 - 20 μCi ^{14}C -Adenin zugesetzt. Nach etwa 12 Stunden werden die Zellen abzentrifugiert, in frischem LSM aufgenommen und für weitere 60 min geschüttelt. Nach Zugabe von cAMP bzw. nach Temperaturshift (Vgl. Ergebnisteil, 1.4.2.) wird 300 μCi ^3H -Uridin/10⁹ Zellen zugesetzt. Eventuellen Schwankungen des Uridin-Pools, die durch cAMP hervorgerufen werden könnten (und so das Ergebnis zu einem gewissen Grad verfälschen würden), wird dadurch vorgebeugt, daß dem Markierungsmedium 80 μM unmarkiertes Uridin zugesetzt wird. Nach 10 min wird die Markierung durch Zugabe von 2.5 ml 50 mM Uridin/10 ml beendet. RNS wird wie unter 5.3. beschrieben aus den markierten Zellen gewonnen.

5.7. Bestimmung der cAMP-Bindung

5.7.1. Gleichgewichtsdialyse

Hierbei wurde die Gleichgewichtsdialyseapparatur Dianorm (Bachofcr) verwendet. Die beiden Teflon-Halbzellen einer Kammer, durch ein Stück einer Visking-Dialyscmembran getrennt, wurden mit je 4 ml MTP-Puffer (= 5 mM MgCl_2 , 100 mM K_2HPO_4 , 1 % Tween 80; pH 7.2) gefüllt, dem in einer der beiden Kammern mitochondriales Protein (500 μg), in der anderen 100 nCi ^3H -cAMP (52 Ci/mmol) zugesetzt war. Nach 4 Stunden, meist aber über Nacht nach 12 Stunden wurde beiden Halbzellen ein Aliquot entnommen und die enthaltene Radioaktivität bestimmt.

Die Differenz (Kammer + Protein) minus (Kammer - Protein) wurde in Mole umgerechnet und auf die jeweilige Proteinmenge bezogen.

5.7.2. Celluloseester-Filter-Bindungstest

CE-Filter halten Rezeptorprotein/cAMP-Komplexe zurück, während freies cAMP nicht gebunden wird (Gilman & Murad, 1974). In einem typischen Inkubationsansatz werden 20 nCi ^3H -cAMP (52 Ci/mmol) zusammen mit 100 μg mitochondrialem Protein in 200 μl MTP-Puffer (s. 5.7.1.) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, über einen CE-Filter in einer Filterabsaugapparatur (Hölzl) abgesaugt (Sauggeschwindigkeit etwa 10 ml/min) und dreimal mit je 6 ml MTP-Puffer gewaschen. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Abzug des Blankwertes (= Ansatz ohne Protein) in Mole cAMP umgerechnet und auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen.

5.8. Bestimmung der Radioaktivität

Wäßrige Proben wurden in Instagel gemessen (10 ml/1 ml Probe). Filtergebundene Radioaktivität wurde nach Trocknen der Filter in folgendem Szintillator gemessen:

0.03 % (w/v)	POPOP	in Toluol
0.5 % (w/v)	PPD	

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach Abkühlung der Proben in den Geräten MARK II oder ISOCAP (Searl Nuclear Chicago).

Für Meßreihen, bei denen die Messung mit externem Standard auf einen Quench hinwies, wurde eine Quenchkorrektur durchgeführt.

5.9. Immunologische Tests

Objektträger (76 x 26 mm) wurden mit 4 ml der folgenden warmen Lösung überschichtet (Duchterlony, 1965):

0.9 % NaCl
1.0 % Agarose
0.1 % Na-azid

Nach Erstarren der Lösung werden etwa 2 mm breite Löcher

ausgestanzt, in die bis zu 30 µl der Antigen- bzw. Antikörper-haltigen Lösungen eingebracht werden. Nach 24-stündiger Diffusionszeit (4 °C) werden alle nicht präzipitierten Proteine durch 3-tägiges Einbringen in destilliertes Wasser herausgewaschen. 10-minütiges Anfärben mit einer Amidoschwarzlösung (0.5 % Amidoschwarz in Methanol : Eisessig : Wasser = 9 : 2 : 9), gefolgt von einer Entfärbung mit 10 % Methanol macht die Präzipitationslinien sichtbar.

Für immunologische Untersuchungen wurden mitochondriale Proteine nach Ebner et al. (1973) in folgendem Puffer solubilisiert:

10 mM	Tris/Sulfat	pH 8.0
140 mM	NaCl	
1 %	Triton X-100	
0.1 %	Na-azid	

5.10. DNS-Filter

5.10.1. Herstellung

DNS wurde nach der von Gillespie und Spiegelman (1965) beschriebenen Methode auf NC-Filter wie folgt gebunden: Proteinfreie DNS wird in 2 x SSC (1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM Na-citrat; pH 7.0) zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst, durch Zugabe von 3 M KOH bis zu einem pH-Wert von 13 in Einzelstränge zerlegt und nach Neutralisation mit HCl auf 0 °C gekühlt über einen in 2 x SSC gewaschenen NC-Filter (Porengröße 0.45 µm) abgesaugt. Nicht gebundene DNS wird durch Waschen des Filters mit 2 x 10 ml 2 x SSC entfernt. Aus den getrockneten Filtern (2 Stunden, 70 °C) werden kreisförmige Filterblättchen der gewünschten Größe ausgestanzt. Pro Filter (Ø 23 mm) wurden zwischen 5 und 50 µg DNS appliziert.

5.10.2. DNS/RNS-Hybridisierung

DNS-Filter (Ø 7 mm) werden in 1 ml folgender Lösung über Nacht bei 36 °C inkubiert:

1/3 Vol. $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -doppelmarkierte RNS, gelöst in TE-Puffer
+ 0.1 % SDS
1/3 Vol. Formamid
1/3 Vol. 2 x SSC (0.02 % Ficoll, 0.02 % BSA, 0.02 %
Polyvinylpyrrolidon)

Nicht hybridisierte RNS wird durch 4-maliges Waschen mit
2 x SSC (0.1% SDS) entfernt.

Zur Auswertung wird die an die getrockneten Filter gebundene
Radioaktivität wie unter 5.8. beschrieben bestimmt; unspe-
zifische Bindung (=Bindung an DNS-freie Filter) wird berück-
sichtigt. Um versuchsbedingte Fehler weitgehend auszuschlie-
ßen, werden nicht die absoluten ^3H -cpm-Werte, sondern das
 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis bei der Auswertung gegeneinander verglichen.
(Der RNS-Markierung mit ^3H -Uridin ging eine Vormarkierung
mit ^{14}C -Adenin voraus, vgl. 5.6.2.)

5.10.3. Bindung von DNS/Protein-Komplexen auf NC-Filter

a) Protein/DNS-Komplexe

NC-Filter halten neben einzelsträngiger DNS auch DNS/Protein-
Komplexe zurück, während doppelsträngige DNS und ein großer
Anteil von Proteinen durch den Filter gesaugt werden (Jones
& Berg, 1966). In einem typischen Versuchsansatz werden 100
 μg mitochondriales Protein, gelöst in MTP-Puffer (s. 5.7.1.)
mit 5 μg mitDNS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (einer
der beiden Reaktionspartner ist radioaktiv markiert), über
NC-Filter abgesaugt und 3 x mit 6 ml MTP-Puffer gewaschen.
Als Blankwert dient ein entsprechender Ansatz, in dem ledig-
lich der radioaktive Reaktionspartner eingesetzt wird.

b) cAMP/Protein/DNS-Komplexe

Hierbei wird wie unter a) geschildert verfahren, mit der
Ausnahme, daß die einzige radioaktive Komponente des Systems
 ^3H -cAMP ist. Als Blankwert wird ein Ansatz mit Protein und
 ^3H -cAMP berücksichtigt.

5.11. Chromatographie an DNS-Cellulose

5.11.1. Herstellung von DNS-Cellulose

Cellulose wurde nach Alberts und Herrick (1970) wie folgt

hergestellt:

Cellex 410 Cellulose wird dreimal mit siedendem Äthanol, einmal mit 100 mM NaOH, einmal mit 1 mM EDTA, einmal mit 10 mM HCl und schließlich mit Wasser bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes gewaschen. Pro Gramm lyophilisierter Cellulose werden 3 ml proteinfreier Kalbsthymus-DNS-Lösung (2 mg/ml in 10 mM Tris/Cl⁻, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA; pH 7.4) gegeben, gut verrührt und 24 Stunden lyophilisiert. Die getrocknete DNS-Cellulose wird in TE-Puffer aufgeschwämmt, zweimal mit 150 mM NaCl, 10 mM Tris/Cl⁻, 1 mM EDTA; pH 7.4 gewaschen und schließlich im gleichen Puffer bis zur Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

5.11.2. Säulenchromatographie an DNS-Cellulose

Auf die mit MTP-Puffer (s. 5.7.1.) äquilibrierte Säule wurde mitochondriales Protein, gelöst in MTP-Puffer, appliziert und so lange mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis kein weiteres Protein mehr eluiert wurde. Bindende Proteine wurden durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration (200 mM, 500 mM, 2 M KCl) eluiert. Bei einigen Versuchen wurde dem Auftragspuffer 10 µM cAMP zugesetzt, im ersten Elutionsschritt wurde dann cAMP weggelassen.

5.12. Jodierung von Proteinen

Hierbei wurde im wesentlichen nach Thorell und Johansson (1971) verfahren:

Aus SDS-Gelen ausgeschnittene Proteinbanden werden zwei Stunden in möglichst wenig 50 mM NaP_i, 1 % SDS; pH 7.4 bei 60 °C geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Gelreste wird dem Überstand bis zu 1 mCi ¹²⁵J⁻, dann unter Schütteln 1/3 Vol. Chloramin T (20 mM in 50 mM NaP_i, pH 7.4) zugefügt. Reaktionsstop erfolgt nach 10 min durch Zugabe von 1/3 Vol. Na₂S₂O₅ (1 mg/ml). Freies J⁻ wird von dem eingebauten Material in einer kleinen Sephadex G-25-Säule (Puffer: NaP_i, pH 7.4) abgetrennt.

5.13. Restriktion von mitDNS

2 - 5 µg Äthanol-gefällte, trockene DNS werden in etwa 20 µl

H₂O dest. gelöst und je nach verwendeter Restriktionsendonuclease mit einem der beiden folgenden Puffer (1/10 Vol.) versetzt:

Puffer 1 (für Hind III, Hpa II): 100 mM Tris/Cl⁻ pH 7.5
100 mM MgCl₂
60 mM Mercaptoäthanol
60 mM NaCl

Puffer 2 (für Hinf I, Alu I, EcoR I): 60 mM Tris/Cl⁻ pH 7.5
60 mM MgCl₂
500 mM NaCl
60 mM Mercaptoäthanol

Pro µg DNS wird 1 U des jeweiligen Enzyms zugesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C können die Proben direkt (Puffer 1) oder nach Äthanol-fällung und erneutem Lösen in TE-Puffer (Puffer 2) gelelektrophoretisch aufgetrennt werden (s. 5.5.1.)

5.14. Photoaffinity-Label

Bis zu 100 µg Protein wurden in 100 µl des folgenden Puffers gelöst:

50 mM MOPS pH 7.2
50 mM NaCl
50 mM NaCl
5 mM MgCl₂
0.5 % Tween 80

und mit 10 µCi ³H-8-Azido-cAMP versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C unter leichtem Schütteln wird die Probe mit einer UV-Lampe (Hanau NN 15/44 VK) im Abstand von etwa 7 cm 15 min bestrahlt. Eine nachfolgende Chromatographie über eine Sephadex G-25-Säule trennt eingebautes von freiem Material ab.

5.15. Weitere Methoden

Begrenzte Proteolyse mit Chymotrypsin von Proteinbanden aus SDS-Gelen wurde wie bei Cleveland et al. (1977) beschrieben durchgeführt.

Tween 80, das sich in SDS-Gelen als störend erwies, wurde durch Chromatographie über Amberlite XAD-2 in 200 mM NaCl, 10 mM MOPS, 1 mM NaN₃; pH 7.2 entfernt.

Volumeneinengung wurde durch Einbringen der in Dialysescläuche überführten Proben in Sucrose bewerkstelligt.

C) Ergebnisse

1.) Die Rolle von cAMP bei der Regulation von Hefemitochondrien

Das cAMP-kontrollierte lac-Operon bei E.coli darf heute als eines der am besten untersuchten Regulationssysteme betrachtet werden (Beckwith & Zipser, 1970; Siebenlist et al., 1980). Ausgangspunkt war die Entdeckung von Makman und Sutherland (1965), daß cAMP in E.coli vorkommt und daß seine Konzentration von der C-Quelle beeinflußt wird. Perlman und Pastan (1968) gelang es dann, zu zeigen, daß extern zugesetztes cAMP die Glucoserepression der β -Galactosidase- und der Tryptophanase-Synthese aufhebt. Chambers und Zubay (1969) schließlich konnten zeigen, daß in vitro für die Stimulation der Transcription der β -Galactosidase mRNS, cAMP und CAP (catabolite activating protein) nötig sind.

Ähnlich den Bakterien unterliegt auch Saccharomyces cerevisiae einer ausgeprägten Glucoserepression, die sich vor allem durch eine Verminderung mitochondrialer Funktionen bemerkbar macht. In beiden Fällen passen sich die Organismen rasch einer neuen Umweltsituation an. Daher und nicht zuletzt wegen der Endosymbiontentheorie bezüglich der Evolution von Mitochondrien (Ashwell & Work, 1970) scheint es naheliegend, zu untersuchen, ob cAMP auch im mitochondrialen Bereich wirkt.

In verschiedenen Arbeiten (Van Wijk & Konijn, 1971; Schlanderer & Dellweg, 1974; Sy & Richter, 1972) konnte gezeigt werden, daß der cAMP-Gehalt bei Glucose-reprimierten Hefezellen wesentlich niedriger ist als bei dereprimierten. Der cAMP-Gehalt konnte mit der Aktivität der Adenylatcyclase korreliert werden (Sy & Richter, 1972 b), einem membrangebundenem Enzym, das die Reaktion $ATP \longrightarrow cAMP + PP_i$ katalysiert. Hefemitochondrien besitzen keine Adenylatcyclase (Sy & Richter, 1972 b). Bandlow (persönliche Mitteilung, 1978) gelang der Nachweis, daß Hefemitochondrien in der Lage sind, cAMP aufzunehmen. Versuche von Fang & Butow (1970) demonstrieren, daß die Zugabe von cAMP zu reprimierten Hefezellen zu einer Derepression der Sauerstoffaufnahme führt. Mahler & Lin (1978) konnten die dereprimierende Wirkung von cAMP auf die ALA-Dehydratase, einem Schlüsselenzym der Häm biosynthese, zei-

gen. Chandrasekaram & Jayaraman (1978) schließlich fanden eine Stimulation der Synthese der mitochondrial synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase durch cAMP.

All diese Untersuchungen machen es sehr wahrscheinlich, daß cAMP in Mitochondrien wirkt. Wenn cAMP Signalcharakter zukommt, so müsste es in Mitochondrien Proteine geben, die ein solches Signal aufnehmen können, d.h. cAMP binden können. Dieses Postulat soll im folgenden Kapitel experimentell geprüft werden.

1.1. Subzelluläre Lokalisierung der cAMP-Bindung bei Saccharomyces cerevisiae

Hierzu wurden Zellen wie im Methodenteil beschrieben (s. Abb. 2) fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mit Hilfe des CE-Filter-Tests auf ihre Befähigung, cAMP zu binden, untersucht. Tab. 2 faßt das Ergebnis zusammen:

Fraktion	^3H -cAMP (cpm) gebunden/ 100 μg Protein
"rohe" Mitochondrienfraktion (lysiert in MTP-Puffer, s. 5.7.1.)	680
postribosomaler, cytoplasmatischer Überstand	70
cytoplasmatische "S-100-Fraktion"	1030

Tab. 2: cAMP-Bindung einzelner Subfraktionen

Je 100 μg Protein der jeweiligen Fraktionen wurden wie im Methodenteil beschrieben (5.7.2.) mit 20 nCi ^3H -cAMP inkubiert und mittels der CE-Filter-Technik auf ihre cAMP-Bindung hin untersucht.

Es zeigt sich, daß lediglich die Mitochondrien- und die cytoplasmatische S-100-Fraktion eine merkliche Bindung zeigen. Dieses Ergebnis deckt sich qualitativ mit dem von Sy & Rich-

ter (1972 a) beschrieben. Diese Autoren schreiben allerdings die in der mitochondrialen Fraktion zu beobachtende Bindung einer cytoplasmatischen Kontamination zu. Der Befund dieser Autoren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell überprüft.

1.1.1. cAMP-Bindung in Mitochondrien

Hierzu wurde eine durch differentielle Zentrifugation gewonnene "rohe" Mitochondrienfraktion wie im Methodenteil unter 5.1.1. beschrieben im Urographingradient nachgereinigt. Die resultierenden Fraktionen wurden mit der unter 5.7.2. beschriebenen CE-Filter-Technik auf ihre Befähigung, cAMP zu binden, untersucht.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis dieses Experiments:

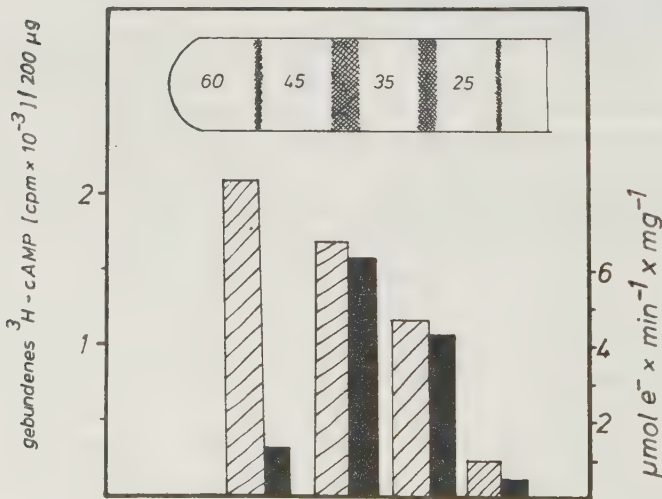


Abb. 4: cAMP-Bindung (schraffiert) und NADH-Oxidase-Aktivität (schwarze Balken) der bei der Nachreinigung einer "rohen" Mitochondrienfraktion im Urographinstufengradient resultierenden Fraktionen. Je 200 μg Protein jeder Fraktion wurde mit 20 nCi $^3\text{H-cAMP}$ versetzt und über CE-Filter abgesaugt. NADH-Oxidase-Aktivität wurde wie bei Burger et al. (1975) beschrieben bestimmt.

Oben: Schematische Darstellung der Bandenverteilung nach der Zentrifugation. Die Zahlen geben den jeweiligen Prozentsatz an Urographin an.

Es zeigt sich, daß in den Fraktionen, in denen sich mitochondriale Partikel anreichern (v.a. 35/45 % sowie 25/35 %; Kriterium: NADH-Oxidase-Aktivität) eine ausgeprägte Bindung festzustellen ist, die auch bei weiterer Nachreinigung der einzelnen Fraktionen erhalten bleibt. Eine cytoplasmatische Kontamination scheint daher unwahrscheinlich zu sein, zumal die 35/45 %-Fraktion, die weitgehend intakte (dichtere) Mitochondrien enthält, eine höhere Bindungsaktivität zeigt als jene, in der sich vor allem Membranfragmente von Mitochondrien befinden (25/35 %). In der 45/60 % Fraktion befinden sich neben Mitochondrien vor allem Membran- und Zellwandfragmente sowie Kerne. Die beobachtete relativ hohe Bindung kann daher nicht ausschließlich den Mitochondrien zugeordnet werden und wird im weiteren nicht näher untersucht. Mitochondriale Fraktionen gleicher Dichte aus ρ^0 -Zellen (z.B. KL 14-4 A ρ^0) zeigen eine deutlich geringere cAMP-Bindung, obgleich das von Sy & Richter (1972 a) beschriebene cAMP-bindende Protein aus ρ^+ - wie aus ρ^0 -Zellen gleichermaßen isoliert werden kann. Aus diesem Befund kann geschlossen werden, daß a) die cAMP-Bindungsaktivität vor allem mit intakten Mitochondrien assoziiert ist und b) die beschriebene cAMP-Bindung nicht mit der von Sy & Richter (1972 a) beschriebenen identisch ist.

Gleichgewichtsdialyse

Parallel zu den Untersuchungen der cAMP-Bindung mittels der CE-Filter-Technik wurden Gleichgewichtsdialysestudien betrieben. Die minimale Dauer der Gleichgewichtseinstellung wurde ermittelt, indem einer der beiden Puffer-gefüllten Halbzellen (s. 5.7.1.) 20 nCi ^3H -cAMP zugesetzt wurde und die Radioaktivität in beiden Halbzellen zu verschiedenen Zeiten bestimmt wurde. Aus Abb. 5, in der die Verteilungskinetik graphisch dargestellt ist, geht hervor, daß der Prozeß der Gleichgewichtseinstellung nach etwa 2 Stunden abgeschlossen ist. Bei allen weiteren Gleichgewichtsdialysestudien wurde eine Zeit von mindestens 4 Stunden gewählt.

Wird in eine Halbzelle in Puffer gelöstes mitochondriales Protein, in die andere Puffer-gelöstes ^3H -cAMP eingebracht, so zeigt sich nach beendeter Gleichgewichtseinstellung ein Überhang von

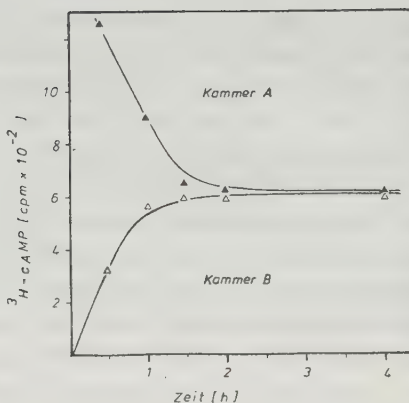


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Gleichgewichtseinstellung von 20 nCi ³H-cAMP in der Gleichgewichtsdialyse. Membran: Visking-Dialysemembran, Ausschlußgrenze 10 kd; Zum Zeitpunkt t = 0 h war die gesamte Radioaktivität in der Halbzelle A.

³H-cAMP in der ersteren. Das bedeutet, daß das eingesetzte Protein eine gewisse Affinität gegenüber cAMP besitzt und so die Gesamtkonzentration an cAMP (freies + gebundenes cAMP) in der entsprechenden Kammer gegenüber der Protein-freien erhöht. Da sowohl die spezifische Radioaktivität von ³H-cAMP als auch die eingesetzte Proteinmenge bekannt ist, lassen sich quantitative Angaben zur cAMP-Bindung machen. So ergibt sich beispielsweise für dereprimierte Wildtypzellen (SM 202) eine Bindung von 0.27 pmol cAMP pro mg Urographin-gereinigtem mitochondrialem Protein.

Da sich die Ergebnisse der Gleichgewichtsdialyse mit den im CE-Filtertest erzielten decken, wurde im weiteren mit der wesentlich einfacher handzuhabenden und schnelleren Filtertechnik gearbeitet.

1.1.2. Lokalisierung der cAMP-bindenden Komponente innerhalb der Mitochondrien

Die bisherigen Versuche lassen es offen, ob es sich bei dem/den

cAMP-bindenden Protein/en um Membranproteine (integriert oder lose assoziiert) oder um lösliche Proteine handelt. Experimenteller Ausgangspunkt für die Beantwortung dieser Frage ist eine Subfraktionierung isolierter Mitochondrien auf Grund ihrer Löslichkeit sowie ihres Sedimentationsverhaltens, wie es im Methodenteil (5.1.2.) beschrieben ist. Jede Fraktion wurde einem cAMP-Bindungstest unterzogen. Die nachstehende Tabelle faßt das Ergebnis zusammen:

Mitochondriale Fraktion	Konzentration der Bindungs- sites (pmol/mg) ⁺	K_D^+
Membranen	0.9	1.7×10^{-9}
S-100-Fraktion	0	-
lösliches Protein	1.8	0.3×10^{-9}

Tab. 3 : cAMP-Bindung in mitochondrialen Subfraktionen

Aus Galactose-gewachsenen wt-Zellen wurden Mitochondrien isoliert, subfraktioniert und von je 100 µg einer jeden Fraktion wurde eine cAMP-Bindungskurve angefertigt.

+ Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D sowie der Zahl der Bindungsstellen ("sites") wird in Abschnitt 1.2.8. ausführlich beschrieben.

Das Ergebnis besagt, daß sich die Hauptaktivität der cAMP-Bindung unter den gegebenen Versuchsbedingungen in der "löslichen" Fraktion nachweisen läßt. Daneben findet man geringere Aktivitäten in der Membranfraktion, wogegen in der S-100-Fraktion, deren Hauptkomponenten Ribosomen darstellen, keine Bindungsaktivität feststellbar ist. (Dies ist übrigens die von Sy & Richter (1972 a) alleinig untersuchte Mitochondrienfraktion; aus den äußerst geringfügigen Bindungsaktivitäten schlossen die Autoren - fälschlich - ,daß Mitochondrien kein cAMP-Rezeptorsystem besitzen.) Es deutet also einiges darauf hin, daß es sich bei der cAMP-bindenden Komponente um ein lösliches Protein handelt. Verstärkt wird diese Annahme durch die oben geschilderten Ergebnisse, daß jene Fraktion im Urographingradienten, in der sich intakte Mitochondrien anreichern, eine höhere Bindungsaktivität besitzt als jene, in der v.a. mitochondriale Membranfragmente

vorliegen. Eine lockere Membranassoziation kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Alle unter 1.1. beschriebenen Resultate zeigen, daß es in Hefemitochondrien cAMP-bindende Komponenten gibt. Im folgenden Abschnitt soll diese Bindung optimiert und eingehend charakterisiert werden.

1.2. Charakterisierung der cAMP-bindenden Komponente aus Hefemitochondrien

Alle der im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit der zwischen 35 und 45 % im Urographingradienten bandierenden Fraktion durchgeführt.

1.2.1. Wahl eines geeigneten Detergenz

Mitochondriale Proteine sind größtenteils stark hydrophobe Membranproteine, die erst nach Zusatz von Detergentien in wäßrigen Puffern löslich sind. Detergentien wiederum könnten Bindungsstellen des Substrats (cAMP) bzw. der bindenden Komponente kaschieren oder denaturieren und so die Effektor-Protein-Wechselwirkungen stören. Abb. 6 zeigt den Einfluß verschiedener ionischer sowie nicht-ionischer Detergentien auf das cAMP-Bindungsverhalten. Es zeigt sich, daß CTAB, das einzige kationische Detergenz, die Bindung am nachhaltigsten stört, ferner, daß milde Detergentien das Bindungsverhalten weniger beeinträchtigen, in vier Fällen sogar eine Erhöhung der Bindung gegenüber dem Detergenz-freien Ansatz (= 2 min sonifizieren) bewirken. Die höchsten Werte ergaben sich bei Verwendung von 1 % Tween 80, was bei allen weiteren Versuchen eingesetzt wird.

1.2.2. Einfluß des pH-Wertes

Abb. 7 zeigt die Bindungsrate von cAMP bei verschiedenen pH-Werten. Sowohl Alkalisierung, stärker noch Ansäuern des verwendeten Puffers reduziert das Ausmaß der Bindung drastisch.

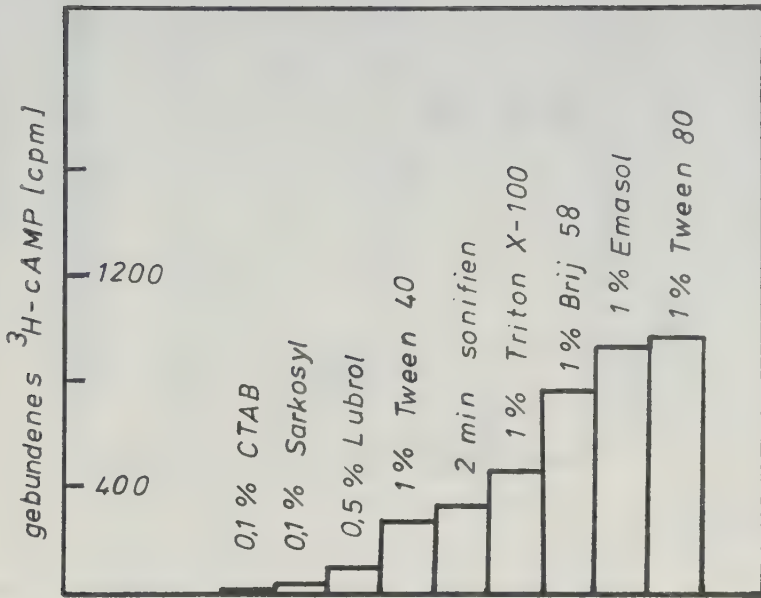


Abb. 6: Einfluß verschiedener Detergentien auf das Bindungsverhalten mitochondrialer Proteine für cAMP

Je 100 μg mitochondriale Proteine, gelöst in einem Puffer mit dem jeweiligen Detergenz, werden wie unter Methoden (5.7.2.) beschrieben einem cAMP-Bindungstest unterzogen.

Wie bei anderen in der Literatur beschriebenen cAMP-Bindungsstudien (Sy & Richter, 1972 a; Walton & Garren, 1970; Gilman & Murad, 1974) werden alle weiteren Versuche bei neutralem pH-Wert durchgeführt.

1.2.3. Optimierung der Waschbedingungen

Als ein kritischer Schritt bei der Methode, cAMP-Bindung mittels CE-Filtern zu bestimmen (vgl. Methoden 5.7.2.), erwies sich das Waschen der Filter. Abb. 8 summiert die Ergebnisse, die bei verschiedenen Waschbedingungen erzielt wurden. Es zeigt sich,

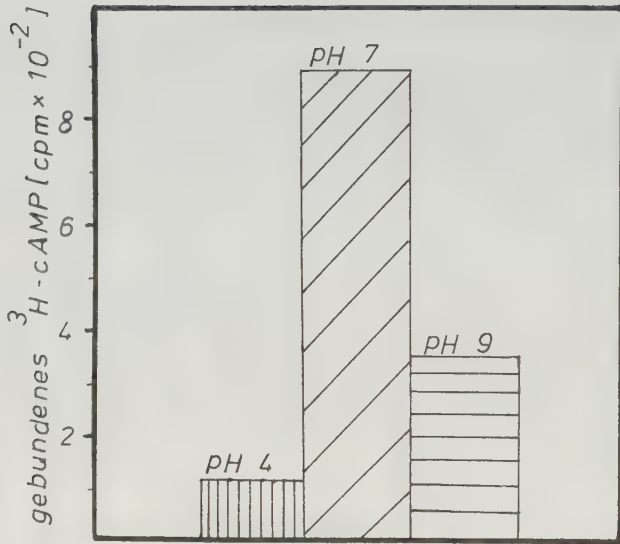


Abb. 7: Einfluß des pH-Wertes auf die cAMP-Bindung

Wie im Methodenteil unter 5.7.2. beschrieben, wurden je 100 μg mitochondriale Proteine bei den angegebenen pH-Werten einem cAMP-Bindungstest unterzogen.

daß wiederholtes Waschen zwar stets den Background (= cAMP-Bindung ohne Protein) reduziert, daß aber die spezifische Bindung (= Bindung von cAMP in Gegenwart von Protein minus Bindung von cAMP ohne Protein) nicht proportional steigt. Zusatz von 100 mM KCl bzw. von 10 % DMSO erbringt keine erhöhte spezifische Bindung. Bei allen weiteren Versuchsansätzen wurde 3 x mit je 6 ml Inkubationspuffer gewaschen.

1.2.4. cAMP-Bindung als Funktion der Zeit

Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit der cAMP-Bindung von der Inkubationsdauer. Es ist ersichtlich, daß bereits nach 5 min ein Plateau erreicht ist. Alle folgenden Ansätze werden 15 min bei Raumtemperatur angesetzt.

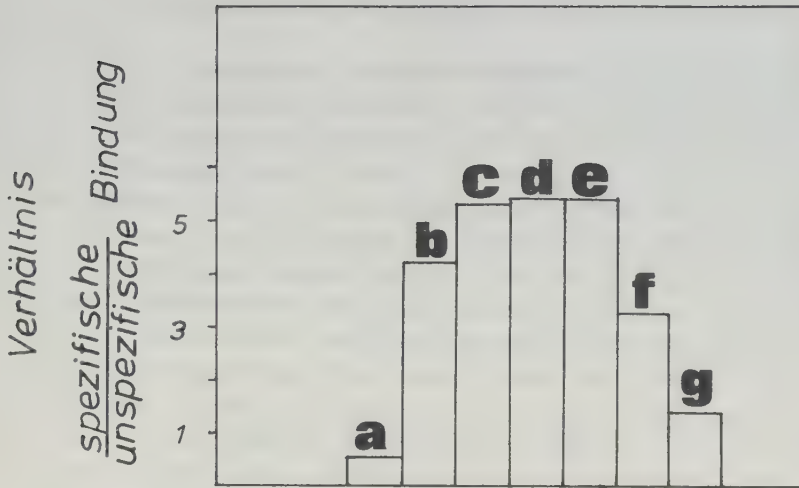


Abb. 8: Beeinflussung des cAMP-Bindungstests durch unterschiedliche Waschprozeduren. cAMP-Bindungstests wurden wie in 5.7.2. beschrieben durchgeführt. Nach dem Absaugen der Probe wurden die Filter wie folgt gewaschen: a) 1 x 6 ml Puffer b) 2 x 6 ml Puffer c) 3 x 6 ml Puffer d) 4 x 6 ml Puffer e) 1 x 6 ml Puffer (100 mM KCl) f) 1 x 6 ml Puffer (10 % DMSO)

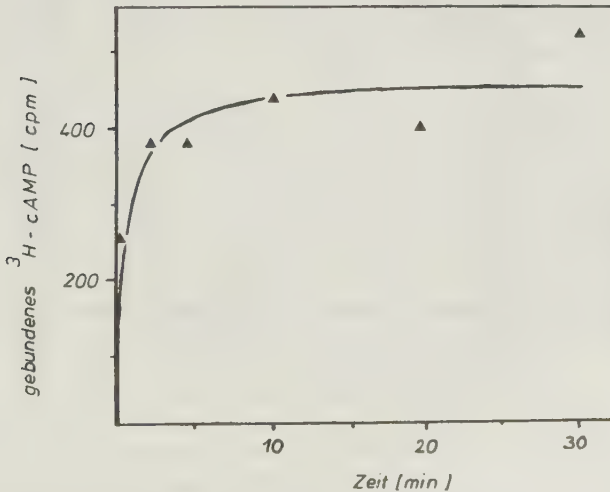


Abb. 9: cAMP-Bindung als Funktion der Zeit
Je 100 µg mitochondriales Protein wurde wie in 5.7.2. beschrieben mit den angegebenen Inkubationszeiten einem cAMP-Bindungstest unterzogen.

1.2.5. Spezifität der cAMP-Bindung

Um die Spezifität der cAMP-Bindung durch mitochondriale Komponenten zu prüfen, wurde dem Inkubationsansatz mit ^3H -cAMP jeweils der zehnfache Überschuß eines anderen, unmarkierten Nukleotids zugesetzt. Im Falle einer Konkurrenz um die vorhandenen Bindungsstellen sollte die gebundene Radioaktivität deutlich verringert werden. Abb. 10 zeigt das Ergebnis dieses Experiments: ATP und ADP lassen die Bindung praktisch unbeeinflusst, 5'-AMP, 2'-AMP und 3'-AMP reduzieren die Bindung geringfügig; cGMP bewirkt eine deutliche Reduktion der Bindung (auf 20 %), aber lediglich Monobutyl-3',5'-cAMP, ein synthetisches Nukleotid, das gelegentlich anstelle von cAMP eingesetzt wird (Kaukel et al., 1972), reduziert die Bindung (neben cAMP selbst) in einem Ausmaß, wie man es von einem ähnlich affinen, kompetierenden Substrat erwartet.

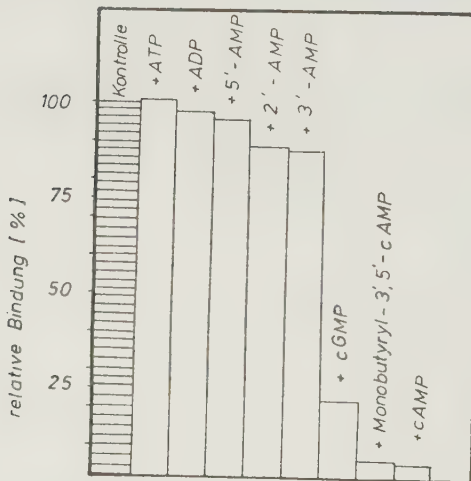


Abb. 10: Einfluß verschiedener Nukleotide auf die cAMP-Bindung
Jedes der angegebenen Nukleotide wurde in 10-fachem Überschuß gegenüber ^3H -cAMP einem typischen Bindungsassay (= 7.2.) zugesetzt.

1.2.6. Beeinflussung der cAMP-Bindung durch Ionen

Einige der in der Literatur beschriebenen cAMP-Bindungstests verwenden Mg^{++} -haltige Puffer (Sy & Richter, 1972 a; Walton & Garren, 1970), andere nicht (z.B. Gilman & Murad, 1974). Daher wurde die Beeinflussung der cAMP-Bindung durch verschiedene Ionen getestet. $CuCl_2$ (5mM) sowie $FeCl_3$ (5 mM) zeigten keinen Effekt, $MnCl_2$ (5 mM) reduzierte die Bindung leicht, während $MgCl_2$ (5 mM) stimulierte. Für $MgCl_2$ wurde daher eine Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Bindung durchgeführt. Abb. 11 zeigt eine typische Optimumskurve mit einem Maximum bei etwa 8 mM. Zusatz von äquimolaren Mengen EDTA reduziert die Bindung auf etwa 30 %.

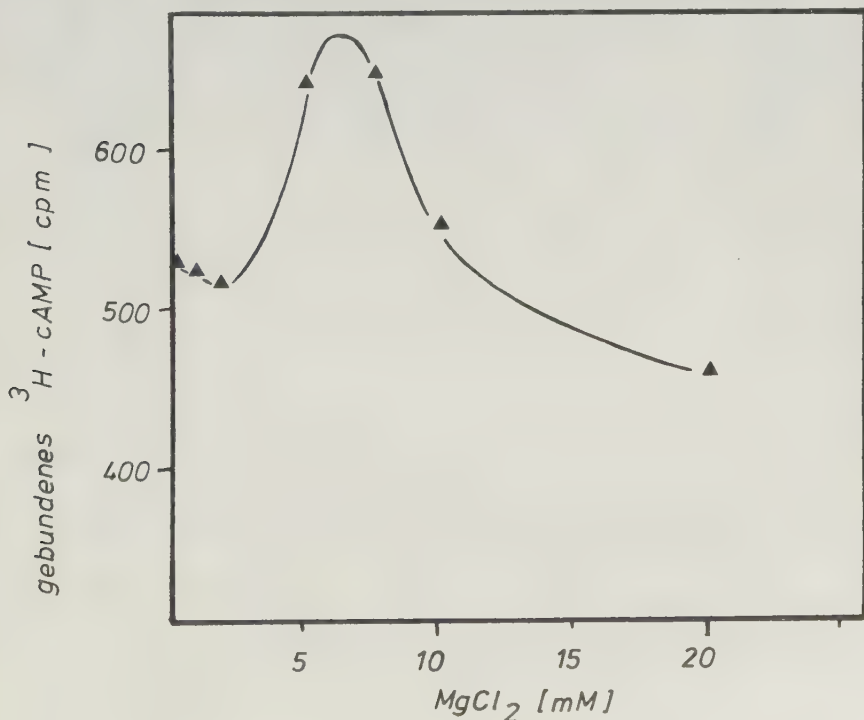


Abb. 11: Mg^{++} -Abhängigkeit der cAMP-Bindung

Je 100 μg mitochondriale Proteine wurden bei den angegebenen Mg^{++} -Konzentrationen wie im Methodenteil beschrieben (5.7.2.) auf cAMP-Bindung untersucht.

1.2.7. Einfluß von Hämin auf die cAMP-Bindung

Ochoa und Mitarbeiter (Datta et al., 1978) beschrieben für das Retikulozyten-System einen Hämin-kontrollierten Inhibitor der Proteinbiosynthese, bei dem Hämin die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase nicht-kompetitiv verhindert. Zur Untersuchung, ob im vorliegenden Fall möglicherweise ein ähnliches System vorliegt, wurden dem Bindungsansatz steigende Mengen Hämin (Endkonzentration 0.1 - 20 μM) zugesetzt. Bei keiner Konzentration an Hämin wurde die cAMP-Bindung beeinträchtigt.

1.2.8. Bindungskonstante und Zahl der Bindungsstellen

Die Darstellung der Bindungskurven im Scatchard-Plot (Scatchard, 1949), in dem die Konzentration des gebundenen Liganden gegen den Quotienten aus der Konzentration des gebundenen und des nicht-gebundenen = freien Liganden aufgetragen wird, erlaubt Aussagen über die Zahl der Bindungsstellen sowie die Ermittlung der Bindungskonstante. Handelt es sich um eine einzige bindende Komponente mit einer oder mehreren gleich affinen Bindungsstellen, so resultiert eine Gerade. Die Zahl der Bindungsstellen n pro Menge an eingesetztem Protein wird ermittelt, indem man auf die (experimentell nicht erreichbare) Situation extrapoliert, in der der freie Ligand in unendlicher Konzentration vorliegt. Für diesen Fall wird der Quotient bound/free gleich 0; dies ist aber der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate, an der die Konzentration des gebundenen Liganden aufgetragen ist. Aus der Steigung der Geraden errechnet sich die Dissoziationskonstante K_D .

In Abb. 12 ist ein typisches Beispiel für einen der ermittelten Scatchard-Plots dargestellt.

Die Dissoziationskonstante errechnet sich wie folgt:

$$\begin{aligned} K_D &= 5.4 \times 10^{-13} / 0.55 \times \text{Probenvolumen} = 9.8 \times 10^{-13} / 225 \mu\text{l} = \\ &= 4.3 \times 10^{-9} \text{ M} \end{aligned}$$

Dieser Wert ist außergewöhnlich klein, verglichen mit einem Wert von 1×10^{-6} im Falle des cAMP/CAP-Komplexes (Emmer et al., 1970) beim lac-Operon von E.coli bzw. von 1.3×10^{-8} bei einem cAMP/CRP-Komplex (CRP = cAMP-receptor-protein) aus der

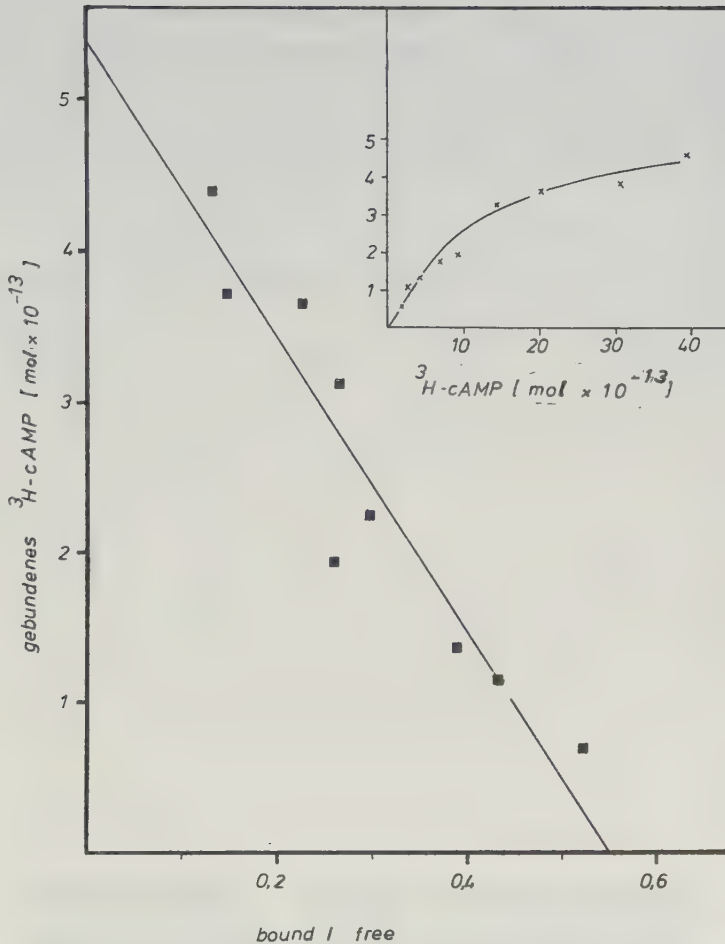


Abb. 12: Scatchardplot der im Insert dargestellten cAMP-Bindungskurve

Insert: cAMP-Bindungskurve: Je 150 μg mitochondriales Protein aus dereprimierten Zellen wurde in einem Volumen von 225 μl mit den angegebenen Mengen an $^3\text{H-cAMP}$ inkubiert und über CE-Filter abgesaugt (vgl. Methoden, 5.7.2.).

"bound"-Werte wurden aus der auf den Filtern zurückgehaltenen Radioaktivität ermittelt, "free"-Werte aus der Differenz (eingesetzte cpm) minus (Filter-gebundene cpm)

Nebennierenrinde beim Rind (Walton & Garren, 1970). Es handelt sich also im Falle der Hefemitochondrien um ein sehr spezifisches und hoch-affines cAMP-bindendes System.

In einem parallelen Ansatz wurde aus den gleichen Zellen für das cytoplasmatische S-100-Pellet ein K_D -Wert von $1.5 \times 10^{-8} M$ ermittelt.

Für die Zahl der Bindungsstellen ergibt sich aus der Geraden (Abb. 12): $b/f = 0 \rightarrow bound = 5.4 \times 10^{-13} \text{ mol}/150 \mu\text{g}$ oder $3.6 \text{ pmol}/\text{mg}$. (Der entsprechende Wert für die cytoplasmatische S-100-Fraktion ist $0.5 \text{ pmol}/\text{mg}$.)

Aus der Konzentration der Bindungsstellen pro mg Protein läßt sich eine grobe Abschätzung der Zahl der cAMP-bindenden Proteine pro mol mitDNS durchführen:

Legt man für mitochondriale Proteine ein durchschnittliches Molekulargewicht von 4×10^4 d zugrunde, so entspricht 1 mg etwa $2.5 \times 10^{-8} \text{ mol}$ Protein. Cirka 7×10^3 mole Protein binden demnach 1 mol cAMP, m.a.W. jedes 7000. Protein in Mitochondrien bindet cAMP. Das cAMP-bindende Protein ist also ein minores Protein. Rechnet man des weiteren überschlagsmäßig mit $1 \mu\text{g}$ mitDNS pro 1 mg mitochondrialem Protein und veranschlagt das MG der mitDNS aus Saccharomyces cerevisiae mit 5×10^7 d (Morimoto et al., 1975), so ergibt sich ein Verhältnis von 3.6 pmol cAMP zu $2 \times 10^{-14} \text{ mol}$ mitDNS, also rund 180 : 1. Man muß bei dieser Abschätzung aber stets im Auge behalten, daß eine Abweichung um einen Faktor 10 durchaus möglich ist.

1.2.9. Photoaffinity Label

Synthetische Analoge von cAMP mit photoaffinen Eigenschaften (d.h. kovalente Anheftung eines Liganden an einen Rezeptor nach erfolgter Bindungsreaktion durch Bestrahlung mit Licht definierter Wellenlänge und Energie) wurden mit Erfolg bei der Charakterisierung cAMP-bindender Proteine eingesetzt (Pomerantz et al., 1975; Walter et al., 1977). Abb. 13 zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem mit mitochondrialem Protein ein Photoaffinity Label mit ^3H - 8-Azido-cAMP durchgeführt wurde (detaillierte Beschreibung siehe Methodenteil 5.14). Nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel und Autoradiographie wird eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kd sichtbar (sie läuft knapp über dem mitochondrialen Trans-

lationsprodukt Var 1, dessen Molekulargewicht 42 - 44 kd beträgt). Die Bande verschwindet, wenn das Experiment in Gegenwart eines 10-fachen Überschusses an unmarkiertem cAMP durchgeführt wird. Damit ist gezeigt, daß 8-Azido-cAMP und cAMP um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Im Gegensatz dazu kompetiert nicht cyclisches 5'-AMP nicht.

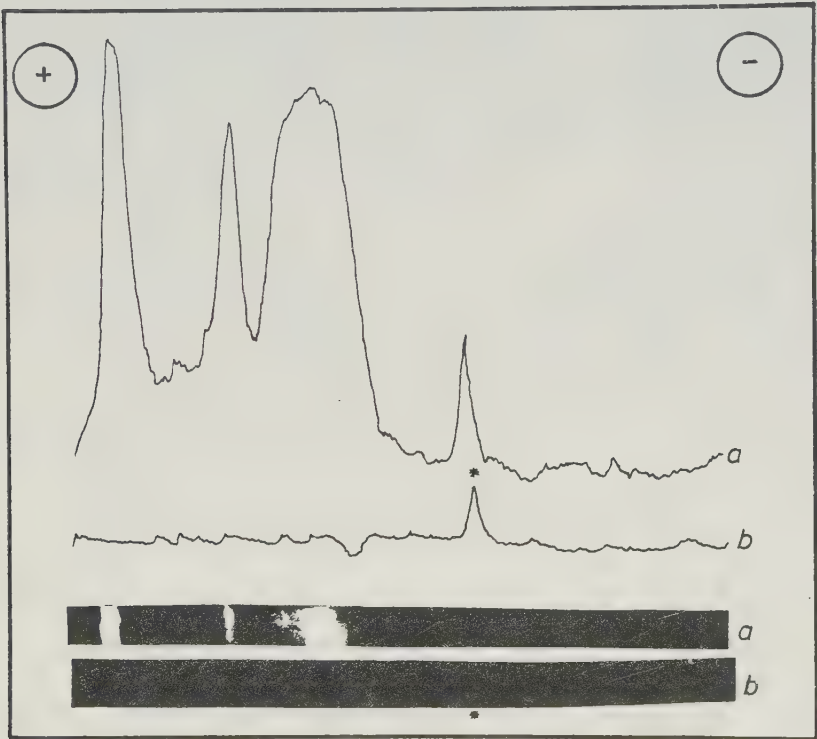


Abb. 13: Coelektrophorese von mitochondrialen Proteinen, die einmal in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ (a), einmal mit ^3H -8-Azido-cAMP (b) markiert wurden.
Unten: Autoradiogramm
Oben: dazugehörige Densitogramme
Der Stern kennzeichnet die im Druck schlecht sichtbare Bande von b).
Laufrichtung von rechts nach links

1.2.10. Ort der Synthese des cAMP-bindenden Proteins aus Mitochondrien

Die Tatsache, daß das fragliche Protein im eben geschilderten Photoaffinity Label-Experiment mit keinem der im Autoradiogramm sichtbaren mitochondrialen Translationsprodukte comigriert, ist noch kein sicherer Hinweis darauf, daß die Synthese an cytoplasmatischen Ribosomen stattfindet. Die im Abschnitt 1.2.8. getroffenen Abschätzungen weisen es als minores Protein aus, das möglicherweise im Autoradiogramm eines SDS-Gels, in dem gesamt-mitochondriales Protein aufgetrennt wurde, nicht mehr nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurde diese Fragestellung wie folgt angegangen (vgl. Tab. 4):

Mitochondrien wurden aus Zellen isoliert, die entweder in Gegenwart von CAP (a, b, c) oder von CHX (d, e, f) mit $^{35}\text{SO}_4^-$ radioaktiv markiert waren. Um in beiden Fällen die gleiche spezifische Radioaktivität zu erhalten, wurden den in Gegenwart von CAP markierten Mitochondrien unmarkiertes mitochondriales Protein beigemischt. Gleiche Mengen der Proteine wurden mit ^3H -cAMP (c, f) versetzt und über CE-Filter abgesaugt (vgl. Methoden 5.7.2.). Aus der gebundenen Radioaktivität wurde das Verhältnis des gebundenen ^3H -cAMP zu CAP- bzw. CHX-resistent markiertem Protein ermittelt. In Tab. 4 ist das Ergebnis dieses Experiments zusammengefaßt.

In den Versuchen c und f, bei denen gleiche Proteinmengen mit gleicher cAMP-Konzentration inkubiert wurden, werden gleiche absolute Mengen an ^3H -cAMP gebunden, d.h. in beiden Versuchsansätzen sind tatsächlich gleiche Mengen an cAMP-bindendem Protein vorhanden. Die durch cAMP bewirkte Steigerung der Bindung von markiertem Protein ist für in Gegenwart von CAP markiertes Protein (a - c) mit 28.5 % deutlich stärker ausgeprägt als für in Gegenwart von CHX markiertes Protein (d - f), m.a.W. die cAMP-bindende Komponente wird aller Voraussicht nach an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet. Sollte es sich - entgegen den bislang vorliegenden Daten - um mehrere bindenden Komponenten handeln, so gilt das Gleiche für die Mehrzahl von ihnen.

Probe	³⁵ S-Markierung in Gegenwart von	cAMP	³ H-cAMP	gebundene cpm ³ H ³⁵ S	³ H/ ³⁵ S	Steigerung der ³⁵ S-Bin- dung durch cAMP
a	CAP	-	-	0	144	-
b	CAP	+	-	0	188	-
c	CAP	-	+	357	181	1.9
						28.5 %
d	CHX	-	-	0	143	-
e	CHX	+	-	0	151	-
						6.3 %
f	CHX	-	+	365	153	2.4

Tab. 4: Je 50 µg mitochondriales Protein aus Zellen, die in Gegenwart von CAP (a, b, c) bzw. CHX (d, e, f) mit ³⁵SO₄ markiert wurden, werden ohne (a, d), mit unmarkiertem (b, e) und mit ³H-cAMP (c, f) inkubiert und über CE-Filter abgeseugt. Die Filtergebundenen cpm wurden bezüglich Blank und spill-over korrigiert. Die Steigerung der ³⁵S-Bindung durch cAMP (letzte Spalte) errechnet sich aus den ³⁵S-Werten wie folgt:

$$\frac{\left(\frac{b+c}{2}\right) - (a)}{(a)} \times 100 (\%) \quad \text{bzw.} \quad \frac{\left(\frac{e+f}{2}\right) - (d)}{(d)} \times 100 (\%)$$

Die beiden voranstehenden Kapitel 1.2. sowie 1.3. beschäftigten sich mit dem Nachweis und der eingehenden Charakterisierung der mitochondrialen cAMP-bindenden Komponente. Bei allen bislang beschriebenen Versuchen wurde gesamt-mitochondriales Protein eingesetzt. Der folgende Abschnitt widmet sich nun der Frage der Anreicherung dieses Proteins.

1.3. Anreicherung der cAMP-bindenden Komponente

Im folgenden wird untersucht, inwieweit säulenchromatographische Methoden mit cAMP-substituierten Matrizen zur Anreicherung geeignet sind.

1.3.1. cAMP-Sepharose

Bei diesem Säulenmaterial ist der Adeninrest von cAMP über C⁸ des Purinrings über einen p-Diazobenzol-Hexamethyldiamin-Spacer an Sepharose 6 B gekoppelt (Lee & Kaplan, 1975). Zur Reduktion unspezifischer Bindung wurde nach dem Säulendurchlauf mit einem 5'-AMP-haltigen Puffer nachgewaschen, bevor die cAMP-spezifisch bindenden Komponenten mit cAMP-haltigem Puffer eluiert wurden. Alles restliche gebundene Material wurde mit einem Puffer mit hoher Ionenstärke (2 M KCl) entfernt. Alle eluierten Fraktionen wurden erschöpfend gegen cAMP-freien Puffer dialysiert, bevor sie in einem cAMP-Bindungsassay eingesetzt wurden. Die nachstehende Tabelle (Tab. 5) zeigt das Resultat einer solchen Chromatographie.

Man erzielt mit der beschriebenen Methode tatsächlich eine gewisse Anreicherung der cAMP-bindenden Komponente: 15 % des Proteins (Fraktion 3) stellen fast 40 % der cAMP-Bindung. Die Methode erweist sich allerdings nur als bedingt tauglich, da 1) immerhin rund 60 % der bindenden Aktivität in anderen Fraktionen gefunden wird und 2) offenbar ein nicht unbeträchtlicher Anteil des cAMP-Eluats von anderen, nicht cAMP-bindenden Proteinen gestellt wird (15 % des eingesetzten Proteins werden mit cAMP eluiert!).

1.3.2. cAMP-Agarose

Bei dem zweiten, kommerziell erhältlichen Säulenmaterial, das

Fraktion	mg Protein (= %)	cpm bound/100 µg	Anteil der cAMP-Bindung (%)
Durchlauf	9.2 (52 %)	35	8.5
100 mM KCl + 100 mM 5'-AMP	3.4 (19 %)	410	36.6
100 mM KCl + 100 mM cAMP	2.7 (15 %)	580	38.9
2 M KCl	<u>2.5 (14 %)</u>	240	<u>16.0</u>
	17.8 (100 %)		100

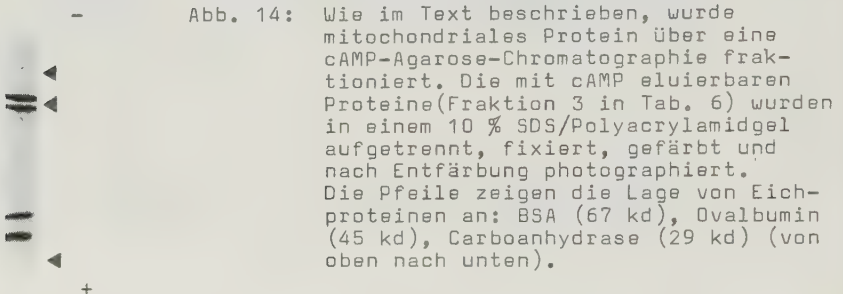
Tab. 5: cAMP-Sepharose-Chromatographie
Mitochondriales Protein aus Galactose-gewachsenen Zellen wurde wie im Text beschrieben an einer cAMP-Sepharose-Säule fraktioniert. Je 100 µg der einzelnen Fraktionen wurden nach erschöpfender Dialyse im cAMP-Bindungsassay (s. Methoden, 5.7.2.) eingesetzt.

getestet wurde, ist der Purinring von cAMP an C⁸ über seine Aminogruppe mit einem Oxyäthyl-Spacer an Agarose gekoppelt (Gill et al., 1976). In einem dem oben beschriebenen entsprechenden Versuch ergab sich folgendes Ergebnis (Tab. 6):

Fraktion	mg Protein (= %)	cpm bound/100 µg	Anteil der cAMP-Bindung (%)
Durchlauf	31.7 (54.9 %)	30	7.8
100 mM KCl + 100 mM 5'-AMP	17.6 (29.9 %)	440	64.0
100 mM KCl + 100 mM cAMP	5.4 (9.3 %)	640	28.2
2 M KCl	<u>3.5 (5.8 %)</u>	0	<u>0</u>
	58.2 (99.9 %)		100

Tab. 6: cAMP-Agarose-Chromatographie
Details siehe Legende zu Tab. 5.

Auch in diesem Fall ist eine Anreicherung der bindenden Komponente in Fraktion 3 zu beobachten: 9 % des eingesetzten Proteins stellen fast 1/3 der gesamten Bindung. Durch Erhöhen der Ionenstärke auf 100 mM KCl + 100 mM 5'-AMP bzw. cAMP werden 40 % des gesamten Proteins eluiert, die zusammen über 90 % der gesamten cAMP-Bindung ausmachen. Bei Auftrennung der mit cAMP eluierbaren Proteine im SDS-Polyacrylamidgel findet man insgesamt 4 Banden mit dem ungefähren Molekulargewicht von 48, 41, 35 und 32 kd (Abb. 14).



1.4. Versuche zur biologischen Funktion des cAMP-bindenden Systems aus Hefemitochondrien

Nach den bisherigen Versuchen, die ein mitochondriales cAMP-bindendes System mit den herausragenden Eigenschaften einer ausgeprägten Spezifität, einer extrem hohen Bindungskonstante sowie der relativ geringen Zahl an sites beschreiben, wird nachfolgend die biologische Funktion dieses Systems untersucht. Ausgangspunkt für die Suche nach einer cAMP-bindenden Komponente war die Beobachtung, daß sich Mitochondrien bei Hefe in ihren Syntheseleistungen rasch neuen Umweltsituationen wie der Katabolitrepression anpassen und in dieser Hinsicht bakteriellen Systemen ähneln. Bei letzteren wiederum ist bekannt, daß cAMP als Signal eine überragende Rolle zukommt. Mit dem Nachweis eines cAMP-bindenden Systems in Hefemitochondrien ist die erste und wichtigste Voraussetzung für die Existenz eines ähnlich arbeitenden Systems erfüllt.

Da der cAMP-Gehalt in Saccharomyces cerevisiae von der Konzentration an vergärbarem Substrat kontrolliert wird (Van Wijk & Konijn, 1971; Sy & Richter, 1972), soll der erste Teil des folgenden Abschnitts die Frage klären, ob sich auch hinsichtlich des K_D -Wertes und/oder der Zahl der sites des cAMP-bindenden Systems Unterschiede zwischen Glucose-reprimierten und dereprimierten Zellen feststellen lassen.

1.4.1. Einfluß der Glucoserepression auf das mitochondriale cAMP-bindende System

Hierzu wurden cAMP-Bindungskurven eines Wildtyps sowie von zwei Mutanten mit verändertem Repressions-/Derepressionsverhalten jeweils unter reprimierenden und nicht-reprimierenden Wachstumsbedingungen aufgenommen.

Bei der Mutante ccr-91 sind sämtliche mitochondrialen Funktionen u n a b h ä n g i g von der Art und Konzentration der Kohlenstoffquelle konstitutiv dereprimiert (Schmitt, 1980). Die Mutante SM 201 trägt die mitochondriale Mutation tsm 8 (Handwerker et al., 1973; Bandlow et al., 1977), die unter anderem eine starke Verzögerung der Kinetik der Derepression sowie der aeroben Adaptation und nach shift auf die nicht-permissive Temperatur von 36 °C einen raschen Rückgang mitochondrialer Makromolekülsynthesen bewirkt. Die aus Titrationskurven ermittelten Charakteristika der cAMP-Bindung von mitochondrialem Protein der untersuchten Stämme sind in in Tab. 7 zusammengefaßt.

Die verschiedenen K_D -Werte liegen alle in einem Bereich zwischen 1×10^{-9} und $7 \times 10^{-9} M$ und lassen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Bei der Zahl der Bindungsstellen, deren Bestimmung auf Grund der Darstellungsart mit weniger Unsicherheit behaftet ist als jene der K_D -Werte, sind zwar zwischen dereprimierten und reprimierten Zellen ebenfalls keine gravierenden Unterschiede zu erkennen (Faktor 1.3 bis 2.5), auffällig ist allerdings, daß in allen Fällen die Zahl der sites bei dereprimierten Zellen gegenüber reprimierten erhöht ist. Die Zahl der Bindungsstellen scheint darüber hinaus zu einem gewissen Grad stammbabhängig zu sein.

Stamm	C-Quelle	K_D	Zahl der sites (pmol/mg)
SM 11-6c (haploid, wt)	Glycerin	1×10^{-9}	3.8
SM 11-6c	Glucose	3×10^{-9}	2.4
ccr-91	Glycerin	1×10^{-9}	3.1
ccr-91	Glucose	1.9×10^{-9}	2.6
SM 202 (diploid, wt)	Glycerin	2.5×10^{-9}	3.1
SM 202	Glucose	2.6×10^{-9}	1.5
SM 201	Glycerin (23 °C)	2.7×10^{-9}	2.9
SM 201	Glucose (23 °C)	6.9×10^{-9}	1.3
SM 201	Glycerin (36 °C)	1.3×10^{-9}	2.7
SM 201	Glucose (36 °C)	1×10^{-9}	1.1

Tab. 7: K_D -Werte und Zahl der Bindungsstellen verschiedener Stämme unter reprimierenden und dereprimierenden Wachstumsbedingungen

Mitochondriale Partikel der Derepressionsmutante ccr-91 sowie des dazugehörigen Wildtyps SM 11-6c, ferner der Temperatur-sensiblen Mutante SM 201 und des isonucleären Wildtyps SM 202 wurden im cAMP-Bindungsassay (s. Methoden 5.7.2.) eingesetzt. Die Bindungskonstante K_D sowie die Zahl der Bindungsstellen wurden durch Darstellung der Meßpunkte im Scatchard-Plot (1.2.8.) ermittelt.

Für die beiden untersuchten Mutantenstämme kann festgehalten werden, daß weder ein verändertes Bindungsverhalten gegenüber cAMP noch die Zahl verfügbarer Bindungsstellen als Ursache für den jeweils beobachteten Mutanten-Phänotyp in Frage kommen. Eine Bestimmung des cAMP-Gehalts der Zellen dieser Stämme sowie der Adenylatcyclase-Aktivität erschien mir im Rahmen einer detaillierten Charakterisierung der Stämme von Interesse. Im Einklang mit den eben geschilderten Ergebnissen steht, daß

bei allen vier untersuchten Stämmen nach Photoaffinity Label mit 8-Azido-cAMP im SDS-Gel eine einzige radioaktive Bande mit gleichem Molekulargewicht (45 kd) gefunden wird.

1.4.2. Einfluß von cAMP auf die mitochondriale RNS-Synthese

Der zweite Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich mit der Frage, ob cAMP die mitochondriale Transcription beeinflusst. Ausgangspunkt dafür ist die Beobachtung, daß bei E.coli die Transcription (cAMP-kontrollierter) Operons durch den cAMP-Spiegel (der seinerseits von der Konzentration an vergärbarem Substrat abhängt) beeinflusst wird. Bei E.coli erleichtert der Signalrezeptor, das CAP-Protein, nach Bildung eines ternären Komplexes mit cAMP und DNS die Transcription im Sinne eines positiven Effektors.

Die bisher einzige Arbeit über Wirkungen von cAMP im mitochondrialen System bei Hefe (Chandrasekaran & Jayaraman, 1978) weist nach, daß sich bei cAMP-supplementierten reprimierten Zellen immunologisch größere Mengen der mitochondrial translatierten Cytochromoxidase-Untereinheiten nachweisen lassen als bei nicht-supplementierten, läßt aber die Frage nach der molekularen Ursache dafür offen. Der beobachtete Effekt könnte durch Regulation auf der Ebene der Transcription ebenso wie durch post-transcriptionale Mechanismen wie Translation oder RNS/Protein-processing verursacht werden.

Bei den Untersuchungen zur Beeinflussung der mitochondrialen Transcription durch cAMP wurde der Temperatur-sensible Stamm ts⁻¹³⁶ (Hutchison et al., 1969; Hartwell et al., 1969) verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, daß bei der restriktiven Temperatur von 36 °C die nucleäre RNS-Synthese drastisch reduziert ist bzw. der Export von RNS in das Cytoplasma weitgehend unterbunden ist. Mitochondrien, die nach einem pulse-label bei restriktiver Temperatur isoliert werden, sollten also größtenteils frei von radioaktiv markierter RNS nucleo-cytoplasmatischen Ursprungs sein. Eventuelle Kontamination durch nucRNS auf dieser Stufe wird schließlich dadurch eliminiert, daß die isolierte RNS aus Mitochondrien gegen einen Überschuß Filter-gebundener mitDNS hybridisiert wird.

Die Filter-gebundene Radioaktivität sollte ausschließlich von mitRNS stammen. Eine mit einem anderen, bei der Szintillationsmessung unterscheidbaren Isotop durchgeführte Grundmarkierung dient als Bezugswert.

Das folgende Schema (Abb. 14) faßt die Versuchsdurchführung zusammen:

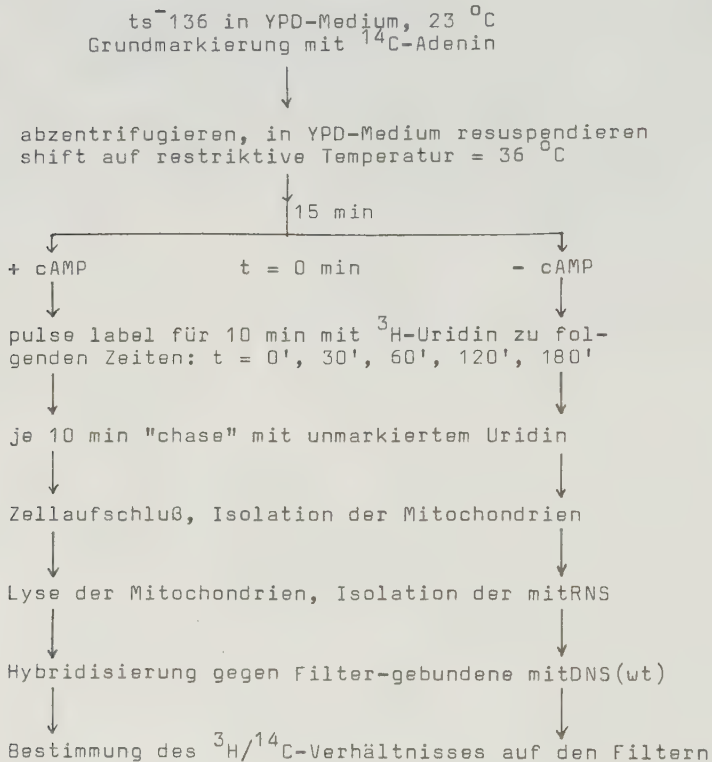


Abb.14: Schematische Darstellung des Versuchs zur Beeinflussung der mitochondrialen RNS-Synthese durch cAMP

Abb. 15 zeigt das Ergebnis des Versuchs der Messung der Zeit-abhängigen Stimulation der mitochondrialen Transcription durch cAMP.

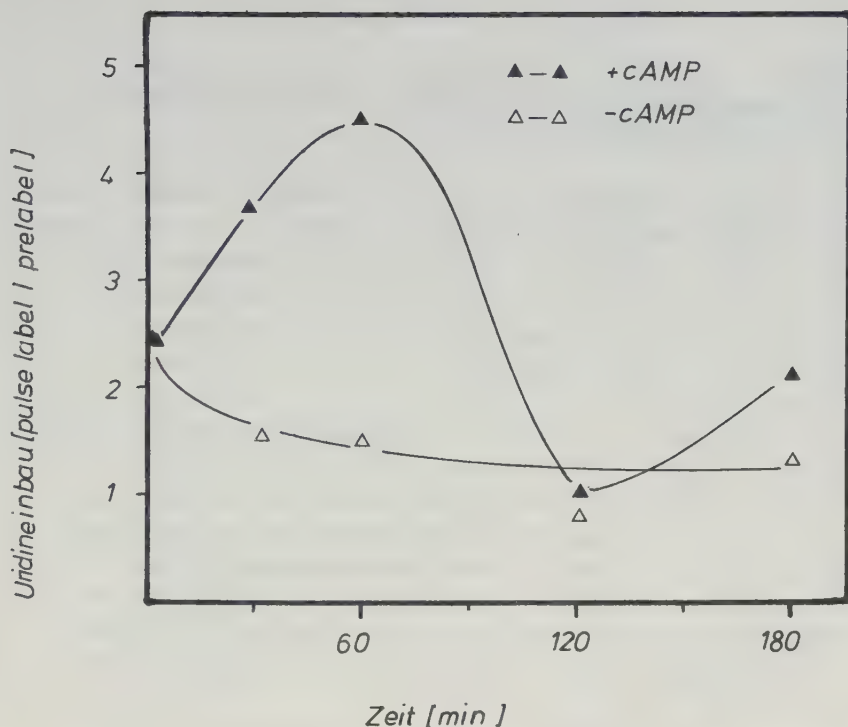


Abb. 15: Einfluß von cAMP auf die mitochondriale RNS-Synthese
Versuchserklärung siehe Text

Während in der Kontrolle (ohne cAMP) das Verhältnis von pulse label zu prelabel nach leichter anfänglicher Abnahme während der drei Stunden mehr oder weniger Konstant bleibt, ist bei den Proben mit cAMP in der ersten Stunde eine deutliche Zunahme des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses zu beobachten, gefolgt von einer Abnahme auf etwa den Ausgangswert ($t = 0$ min). Der Versuch zeigt also, daß cAMP einen Einfluß auf die mitochondriale Transcription hat. Das Experiment erlaubt allerdings keine Aussage darüber, auf welche Weise die RNS-Synthese stimuliert wird. Denkbar wäre eine direkte Stimulierung der RNS-Synthesemaschinerie (RNS-Polymerase, Aktivierung eines Sigma-ähnlichen Faktors etc.), eine erhöhte Verfügbarkeit von an der RNS-Synthese beteiligten Faktoren (Stimulation von deren Neusynthese oder des Processing von Precursoren dieser Faktoren) oder aber eine durch cAMP vermittelte Inaktivierung von Repressoren bzw. Aktivierung von positiven Effektoren oder Kontrollproteinen. Diese Fragestellungen werden zu einem späteren Zeitpunkt noch eingehender untersucht.

1.4.2.1. Selektivität der cAMP-stimulierten, mitochondrialen Transcription

Die vorstehend geschilderten Versuche zeigen eine Erhöhung der mitochondrialen Transcriptionsrate durch cAMP, sie lassen allerdings offen, ob es sich dabei um eine generelle Stimulation handelt oder ob ganz bestimmte Bezirke der mitDNS vermehrt transkribiert werden, während andere Regionen unbeeinflusst bleiben. Um dies experimentell abzuklären, wurde folgender Weg beschritten:

Zellen der Mutante ts⁻136, die mit ¹⁴C-Adenin vormarkiert wurden, wurden auf die nicht-permissive Temperatur gebracht, mit cAMP versetzt (ein Aliquot erhielt kein cAMP = Kontrolle) und nach 60 min mit ³H-Uracil für 10 min pulse-markiert. Die isolierte mitRNS wurde einmal in einem Agarose/Harnstoffgel aufgetrennt, zum anderen gegen einen Überschuß an Filter-gebundener DNS aus verschiedenen rho⁻Petites, deren zurückbehaltene DNS unterschiedliche Regionen der mitochondrialen Wildtyp-DNS beinhaltet (vgl. Abb.1), hybridisiert.

Während sich nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen, ergab sich bei der Auswertung der Hybridisierungsexperimente folgendes Bild (Tab. 8): Die beobachtete cAMP-stimulierte RNS-Synthese ist nicht für alle Regionen der mitDNS konstant. So gibt es Bereiche, bei denen keine Stimulation festzustellen ist (1 C 6573, tRNS-Bereich), während bei anderen (A 14, G 1-11-4, cob bzw. 21 s rRNS-Bereich) fast um den Faktor 4 stimuliert wird. Die mittlere Stimulation der Gesamttranscription (Hybridisierung gegen Wildtyp-DNS) beträgt 20 %.

Aus dem Ergebnis folgt, daß der cAMP-Effekt seine Ursache nicht allein in einer erhöhten Bereitstellung von RNS-Polymerase bzw. deren Substrate haben kann. Für einen derartigen Fall wäre für alle Regionen der mitDNS ein etwa gleicher Stimulationsfaktor zu erwarten (Voraussetzung: vergleichbarer turn over einzelner RNS-Spezies). Die beobachtete Selektivität könnte daher eher durch eine cAMP-abhängige Änderung des turn overs einzelner RNS's oder aber über cAMP-stimulierte Transcriptionsinitiation an bestimmten mitDNS-Regionen erklärt werden. Im letzteren Fall ist die Bildung eines cAMP/Protein/DNS-Komplexes entsprechend dem cAMP/CPR/DNS-Komplex bei E.coli zu postulieren.

DNS aus	zurückbehaltene genetische Marker	genetische Komplexität (kbp)	³ H/ ¹⁴ C Verhältnis +cAMP -cAMP	Steige- rungs- faktor	
SM 202	gesamte mitDNS	75	1.48	1.2	1.2
A 14	cob	6.7	6.33	1.62	3.9
G 1-11-4	21 s rRNS	12.4	13.47	3.69	3.7
1 C 6573	tRNS ^{Asn, Tyr}	2.5	1.28	1.31	1.0
HD 1	oxi 3	7.0	1.65	1.56	1.1
AS 1	oli 1	0.4	1.16	0.86	1.3
C 45 P 1	oxi 1	0.4	6.82	3.73	1.8
1 H 1261	oxi 1, tRNS ^{Met} tRNS ^{Asn, Tyr, (Ile, Ala)}	7.9	3.84	1.15	3.3

Tab. 8: Einfluß von cAMP auf die mitochondriale RNS-Synthese
Mit ^{14}C -Adenin vormarkierte Zellen des Stammes ts₁₃₆
wurden $\pm$ cAMP mit ^3H -Uridin markiert. Die isolierte mit
RNS wurde in separaten Ansätzen gegen einen Überschuß
an Filter-gebundener mitDNS verschiedener rho⁻Petites
hybridisiert. Sauberkeit und genetische Komplexität der
verwendeten DNS's wurde durch Restriktionsanalyse er-
mittelt.

Zur Untersuchung dieser Frage widmet sich das folgende Kapitel
daher der Aufklärung möglicher Zusammenhänge zwischen DNS- und
cAMP-Bindung im mitochondrialen System.

1.5. Zusammenhang zwischen DNS- und cAMP-Bindung

Arbeiten von Nissley et al. (1972) sowie von Riggs et al. (1971)
zeigen, daß das cAMP-Rezeptorprotein (synonym: CAP = catabolite
activating protein, Zubay et al., 1970) praktisch an jede ge-
testete DNS bindet, wenngleich die Bindungsaktivität an die
lac-Promoter-site erhöht ist (Majors, 1975). Eine Untersuchung,
ob mitochondriale Proteine mit einer Affinität zu DNS in der
Lage sind, cAMP zu binden, war daher naheliegend.

1.5.1. DNS-Cellulose-Säulenchromatographie

Hierzu wurden mitochondriale Proteine aus dereprimierten (a)
bzw. dereprimierten (b) Zellen über eine DNS-Cellulosesäule

fraktioniert (s. Methodenteil, 5.11.) und die einzelnen Fraktionen im cAMP-Bindungstest eingesetzt. In der nachstehenden Tabelle (Tab. 9) ist das Ergebnis zusammengefaßt:

Fraktion	mg Protein (= %)	spezifische Aktivität cpm ³ H-cAMP bound/100 µg	prozentualer Anteil an der cAMP-Bindung
a)	50 mM KCl	430	46.2
	200 mM KCl	515	15.3
	500 mM KCl	334	12.8
	2 M KCl	697	25.7
			(100)
b)	50 mM KCl	498	62.1
	200 mM KCl	331	10.1
	500 mM KCl	328	17.0
	2 M KCl	364	10.8
			(100)

Tab. 9: cAMP-Bindung mitochondrialer Proteine nach Fraktionierung über eine DNS-

Cellulose-Säule

Urographin-gereinigte Mitochondrien aus dereprimierten (a) und reprimierten (b) Zellen wurden einer DNS-Cellulose-Säulenchromatographie unterzogen (s. Methoden, 5.11.). Die einzelnen Fraktionen wurden nach erschöpfender Dialyse und Einengung im cAMP-Bindungsassay (Methodenteil, 5.7.2.) eingesetzt.

Man erkennt deutlich, daß sich in beiden Fällen ein erheblicher Anteil (a: 54 %; b: 38 %) der bindenden Aktivität nicht im Säulendurchlauf befindet, sondern erst bei höheren Ionenstärken eluiert wird. Das bedeutet, daß auch im System der Hefemitochondrien Proteine mit DNS-bindenden Eigenschaften cAMP binden können. Die relative Verteilung der bindenden Komponenten in den vier Fraktionen kann zweierlei bedeuten: einmal besteht die Möglichkeit, daß im System mindestens zwei cAMP-bindende Komponenten vorliegen, von denen eine/einige nicht an DNS bindet/binden (also mit 50 mM KCl eluiert werden), während (eine) andere Affinität zu DNS hat/haben (und daher erst bei höheren Salzkonzentrationen eluiert wird/werden). Bei b), also unter reprimierten Bedingungen, läge(n) dann die nicht an DNS bindenden Komponente(n) in relativ größerer Menge vor als bei a) (= dereprimiert); für die DNS-bindende(n) Komponente(n) würde das Reziproke zutreffen. Im Fall, daß nur eine einzige cAMP-bindende Komponente vorliegt (worauf der Kurvenverlauf im Scatchard-Plot sowie die Photoaffinity Label-Experimente hindeuten), müßte man annehmen, daß sich das Protein in einem Gleichgewichtszustand $\text{Protein} + \text{DNS} \xrightleftharpoons{k} \text{Protein/DNS-Komplex}$ befindet. Die Unterschiede zwischen Protein aus dereprimierten und reprimierten Zellen wären dann in einer Veränderung der Gleichgewichtskonstanten k zu suchen, die z.B. durch Effektormoleküle verursacht sein könnte.

Bestimmt man die K_D -Werte der cAMP-Bindung sowohl im 50 mM KCl- als auch im 2 M KCl-Eluat mittels Auftragung der Bindungskurven im Scatchard-Plot, so ergeben sich gleiche Werte ($K_D = 3 \times 10^{-9}$ M). Auch dies deutet auf eine einheitliche cAMP-bindende Komponente hin (Andernfalls müßten verschiedene bindende Komponenten gleiche K_D -Werte besitzen).

1.5.2. Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

Einen weiteren Hinweis darauf, daß mitochondriale Proteine mit DNS-bindenden Eigenschaften in der Lage sind, cAMP zu binden, liefert das folgende Experiment: Mitochondrien werden unter milden Bedingungen (0.2 % Tween 80) lysiert, mit ^3H -cAMP versetzt und auf eine Hydroxylapatit-Säule appliziert. Bei dieser chromatographischen Methode wird mitDNS mit eventuell gebundenen

Proteinen am Säulenmaterial zurückgehalten und erst bei höherer Salzkonzentration (0.4 M KP_i) eluiert, während Proteine, die nicht mit DNS interagieren, bei 10 - 25 mM KP_i eluierbar sind (Fonty et al., 1978). Wie aus Abb. 16 hervorgeht, wird mit 0.4 M KP_i zugleich mit der mit DNS eine gewisse Menge an ^3H -cAMP eluiert, die deutlich über jener des Kontrollversuchs liegt, bei dem die Mitochondrien vor Auftragung auf die Säule mit Sepharose-gebundener DNase (Moorman et al., 1976) behandelt wurden. Offensichtlich bleiben bei schonender Lyse der Mitochondrien vorhandene DNS/Protein-Komplexe weitgehend unbeeinflusst und werden erst durch Behandlung des Mitochondrienlysats mit DNase zerstört. (Eine direkte Affinität von cAMP zu DNS konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden, bei denen Protein-freie mit DNS mit ^3H -cAMP inkubiert und über CE-Filter abgesaugt wurde.)

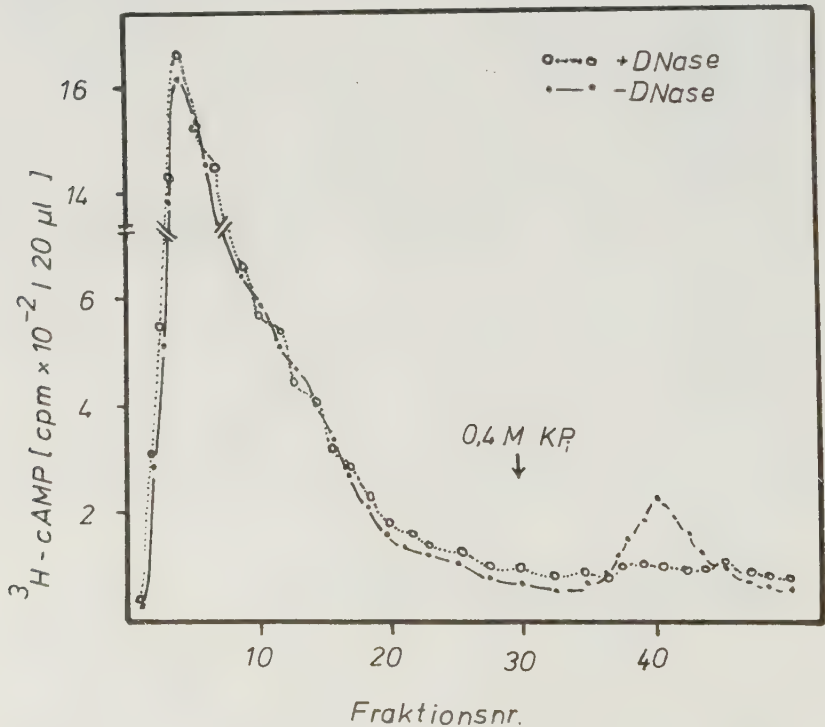


Abb. 16: Elutionsprofil einer Hydroxylapatit-Säule
Mitochondriale Proteine mit bzw. ohne DNase-Behandlung wurden mit ^3H -cAMP versetzt und auf eine HA-Säule aufgetragen. Mit DNS wird mit 0.4 M KP_i eluiert.

1.5.3. Nitrocellulose-Filter-Assay

NC-Filter haben die Eigenschaft, neben einzelsträngiger DNS (ssDNS) auch Doppelstrang (ds)-DNS/Protein-Komplexe zurückzuhalten, während proteinfreie dsDNS sowie ein großer Anteil von freiem Protein nicht gebunden wird (Jones & Berg, 1966).

Versetzt man schonend solubilisierete Mitochondrien mit ^3H -cAMP und saugt sie über NC-Filter ab, so ist nach dem vorstehend Gesagten eine gewisse Menge an Filter-gebundener Radioaktivität zu erwarten, hervorgerufen durch Komplexe aus cAMP/Protein und interner mitDNS (b). Als Kontrolle für Filter-gebundene cAMP/Protein-Komplexe ohne DNS dient eine Probe, die vor Inkubation mit cAMP mit DNase verdaut wurde (a). Ein Zusatz externer mitDNS zum letzteren Ansatz (nach Entfernen der Sepharose-gekoppelten DNase durch Abzentrifugieren) sollte zu einer Erhöhung der Filter-gebundenen Radioaktivität führen (c). In der folgenden Tabelle (Tab. 10) ist das Ergebnis eines solchen Experiments aufgeführt:

Ansatz	DNase-Behandlung	Zusatz externer mitDNS	^3H -cAMP (cpm) gebunden
a	ja	nein	320
b	nein	nein	450
c	ja	ja	510

Tab. 10: Beeinflussung der cAMP-Bindung durch DNS

Je 100 μg mitochondriales Protein mit (a, c) bzw. ohne (b) DNase-Verdauung wurde mit 50 nCi ^3H -cAMP versetzt und nach 15 min über NC-Filter abgesaugt. Bei Ansatz c) wurde vor der Inkubation 5 μg externe mitDNS zugesetzt. Unspezifische Bindung von ^3H -cAMP ohne Protein und DNS wurde berücksichtigt.

Das Ergebnis zeigt, daß zugefügte mitDNS (c) die auf dem NC-Filter zurückbehaltene cAMP-Menge im Vergleich zur DNS-

freien Protein-Probe (a) erhöht und bestätigt außerdem die in 1.5.1. und 1.5.2. getroffenen Befunde, nämlich daß ein gewisser Anteil von cAMP/Protein-Komplexen an mitDNS gebunden vorliegt (b a). Die Tatsache, daß im Ansatz (c) (mit externer DNS) mehr Radioaktivität auf dem Filter zurückbehalten wird als bei (b) (nur interne DNS, mit Sicherheit weniger als 5 µg) ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß in vivo die Menge an verfügbaren Bindungsstellen auf der DNS für cAMP/Protein-Komplexe limitierend wirkt.

Bestimmt man die durch 5 µg mitDNS erzielte Stimulation der cAMP-Bindung von je 200 µg DNase-behandeltem Protein der einzelnen Banden im Urographingradienten (vgl. 5.1.1.), so ergibt sich folgendes Bild (Abb. 17):

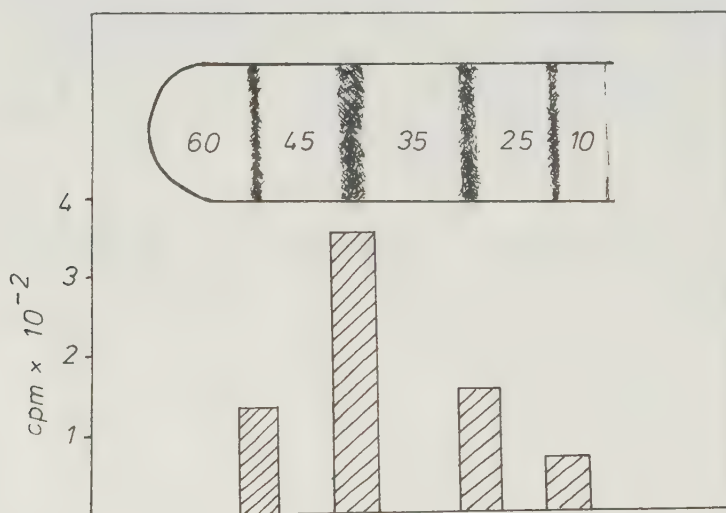


Abb. 17: DNS-stimulierte cAMP-Bindung der einzelnen Fraktionen eines Urographingradienten von Mitochondrien aus dereprimierten Zellen.

200 µg Protein einer jeden Fraktion wurden nach Lyse und DNase-Verdauung mit 20 nCi ³H-cAMP ohne oder mit Zusatz von 5 µg externer mitDNS inkubiert und über NC-Filter abgesaugt. Die DNS-stimulierte Bindung wird ermittelt: (cAMP-Bindung + DNS) minus (cAMP-Bindung - DNS). Oben: Schematische Darstellung des Bandenmusters nach beendiger Zentrifugation, die Zahlen geben den %-satz an Urographin in der jeweiligen Stufe an.

In allen Fraktionen läßt sich eine DNS-stimulierte Erhöhung der cAMP-Bindung beobachten, sie ist aber in der zwischen 35 und 45 % Urographin bandierenden Fraktion bei weitem am stärksten ausgeprägt. Damit läuft die Verteilung der cAMP-Bindung und der DNS-stimulierten cAMP-Bindung nicht parallel (vgl. Abb.4), m.a.W. die cAMP-Bindungsstimulation durch DNS scheint ein spezifisch in Mitochondrien zu beobachtendes Phänomen zu sein, wohingegen andere Fraktionen, vor allem die zwischen 45 und 60 % bandierende (s. Abb. 4) cAMP-Bindungsaktivität besitzen, die nicht mit DNS assoziierbar ist.

1.5.4. DNS-Cellulose-Chromatographie in Gegenwart und Abwesenheit von cAMP

Die bislang unter 1.5. beschriebenen Versuche zeigen, daß mitochondriale cAMP-bindende Proteine teilweise an mit DNS gebunden vorliegen. Offen bleibt die Frage, ob cAMP auf diese Bindung einen Einfluß im Sinne eines positiven Modulators (Stimulation) hat oder aber im Gegenteil das Gleichgewicht $\text{cAMP/Protein/DNS} \rightleftharpoons \text{cAMP/Protein} + \text{DNS}$ nach rechts, also im Sinne einer Abdissoziation des Proteins von der DNS, verschiebt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde folgender Weg beschritten: Mitochondriale Proteine, in einem cAMP-freien Puffer gelöst, werden nach Verdauung mit DNase auf eine DNS-Cellulose-Säule appliziert. Die Säule wird mit dem Auftragspuffer so lange gewaschen, bis kein Protein im Eluat mehr nachweisbar ist. Nun wird dem Waschpuffer cAMP zugesetzt: wenn cAMP im Sinne eines negativen Effektors wirken sollte, so müßten nun Proteine von der DNS abdissoziiert und im Eluat nachweisbar werden. In einem zweiten Schritt wird nun das erste Eluat (= alle in Abwesenheit von cAMP nicht an DNS bindenden Proteine) mit $10 \mu\text{M}$ cAMP versetzt, auf eine zweite DNS-Cellulose-Säule aufgetragen und solange mit cAMP-haltigem Puffer gewaschen, bis das Eluat proteinfrei ist. Für den Fall, daß cAMP im Sinne eines positiven Modulators wirkt, sollten Proteine an DNS binden, die sich unter den Chromatographiebedingungen der ersten Säule als "nicht an DNS bindend" erwiesen. Eluiert werden sie dadurch, daß man im Waschpuffer cAMP wegläßt (vgl. Abb. 15). Die nachstehende Tabelle (Tab. 11) faßt das Ergebnis eines solchen Experiments zusammen:

	Fraktion	Protein (%)	cAMP-Bindung (%)
erste DNS-Cellulose- säule	Durchlauf ohne cAMP	87	36
	+ cAMP	1.6	4
	2 M KCl	11.4	60
		100	100
zweite DNS-Cellulosesäule	Durchlauf mit cAMP	80	18.4
	ohne cAMP	2.4	4.8
	2 M KCl	4.5	12.7
		86.9	35.9

Tab. 11: DNS-Cellulosechromatographie mit und ohne cAMP

Mitochondriales Protein wurde auf eine DNS-Cellulose-Säule appliziert, anschließend wurde mit cAMP und schließlich mit 2 M KCl eluiert. Der erste Durchlauf wurde mit 10 μ M cAMP versetzt und erneut auf eine zweite DNS-Cellulose-Säule appliziert. Die Elutions-schritte bestanden diesmal a) im Weglassen von cAMP und b) mit 2 M KCl. Zur Messung der cAMP-Bindungs-aktivität wurden alle Fraktionen exzessiv dialysiert.

Die nach Zugabe von cAMP zum Waschpuffer in der ersten Säule eluierten Proteine zeigen im CE-Filtertest praktisch keine cAMP-Bindung und werden somit aller Voraussicht nach nicht spezifisch durch cAMP, sondern eher auf Grund der veränderten Ionenbedingungen eluiert. Allein durch Zugabe von cAMP zum Auftragspuffer bindet bei Säule II immerhin rund 7 % des Proteins an DNS, 30 % davon läßt sich durch Weglassen von cAMP eluieren. Dieses Ergebnis deutet also ganz in Richtung auf einen positiv modulierenden Einfluß von cAMP auf die Bindung mitochondrialer Proteine an DNS. Die Tatsache, daß der größere Anteil des bindenden Proteins nicht durch fehlendes cAMP von der Säule abdissoziiert, legt die Vermutung nahe, daß cAMP zwar die Bindung an DNS erleichtert/ermöglicht, aber offenbar nicht oder nur sehr eingeschränkt zur Aufrechterhaltung dieser Bindung nötig ist.

Diese Situation erinnert in gewisser Weise an die Befunde über RNS-Polymerase von E.coli, wo die Bindung an Promoter-DNS durch einen sigma-Faktor katalysiert wird, der aber im weiteren Verlauf der Transcription nicht mehr nötig ist und abdissoziiert (Hinkle & Chamberlin, 1972).

Um zu prüfen, ob die cAMP-vermittelte Bindung von Proteinen ausschließlich auf cytoplasmatisch synthetisierte Proteine zurückzuführen ist oder ob auch mitochondriale Translationsprodukte eine Bindung von cAMP an mitDNS bewirken, wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen das oben geschilderte Experiment mit radioaktiv markierten Proteinen durchgeführt, und zwar a) mit CAP- und b) mit CHX-resistenter Markierung. Die nachstehende Tabelle (Tab. 12) zeigt das Ergebnis:

a) Markierung in Gegenwart von CAP

Fraktion	% der eingesetzten Radioaktivität	
Durchlauf ohne cAMP	86.2	
+ cAMP	1.6	
2 M KCl	12.2	
	100	
Durchlauf + cAMP	79.4	
ohne cAMP	2.2	
2 M KCl	4.6	
	86.2	

erste
DNS-Cellulose-Säule

zweite
DNS-Cellulose-Säule

b) Markierung in Gegenwart von CHX

Fraktion	% der eingesetzten Radioaktivität	
Durchlauf ohne cAMP	94.0	
+ cAMP	1.75	
2 M KCl	4.2	
	99.95	
Durchlauf + cAMP	85.7	
ohne cAMP	4.5	
2 M KCl	3.7	
	93.9	

erste
DNS-Cellulose-Säule

zweite
DNS-Cellulose-Säule

Die Tabelle zeigt, daß sowohl CAP- als auch CHX-resistent markierbare Proteine in Gegenwart von cAMP an DNS binden, die ohne cAMP offenbar nicht binden (a, b: zweite DNS-Cellulose-Säule mit den Elutionsschritten "ohne cAMP" bzw. "2 M KCl"). Im Fall der CHX-resistent markierbaren Proteine (= mitochondriale Translationsprodukte), für die das Ergebnis in Abb. 18 noch einmal graphisch dargestellt ist, kommt dieses Resultat einigermaßen überraschend. Denn nach allem, was bisher an Daten vorlag, war nicht mit einer cAMP-stimulierten DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte zu rechnen. Um zu prüfen, um welche(s) mitochondriale(s) Translationsprodukt(e) es sich bei den durch Weglassen von cAMP eluierbaren Proteinen handelt, wurden sie in einem SDS/Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Anfärbung und Autoradiographie resultiert das in Abb. 19 dargestellte Bild.

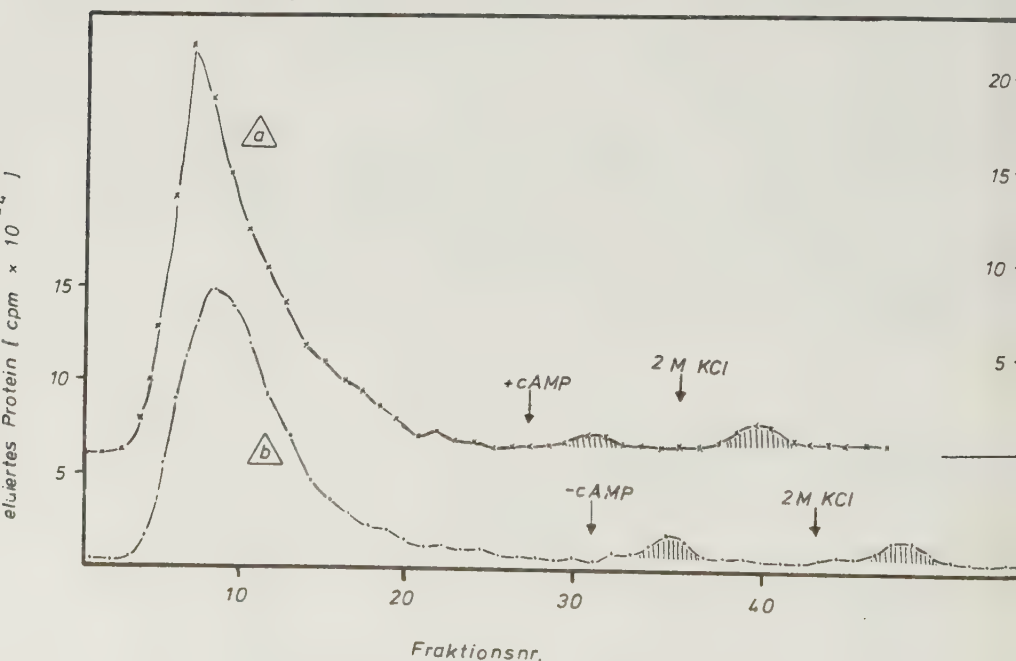


Abb. 18: Elutionsprofil CHX-resistent markierter mitochondrialer Proteine von einer DNS-Cellulose-Säule
a) Auftragung ohne cAMP/ Zugabe von cAMP/ 2 M KCl
b) Auftragung des 1. Durchlaufs + cAMP/ ohne cAMP/ 2 M KCl

Detaillierte Angaben siehe Methodenteil 5.11.

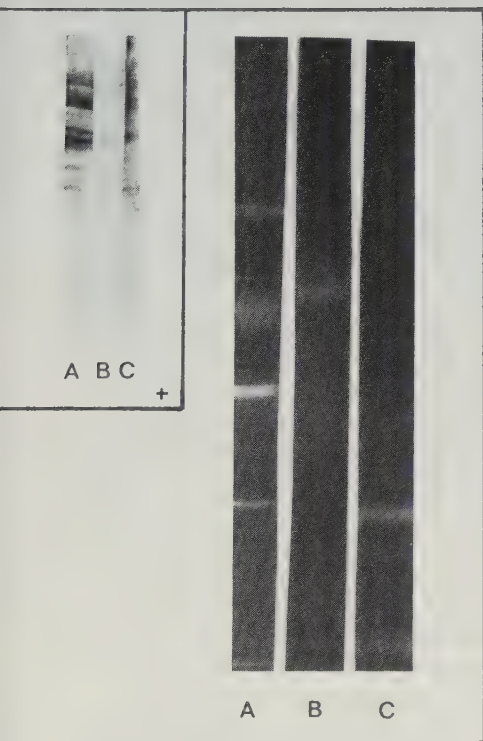


Abb. 19: SDS/Polyacrylamid-gel-elektrophoretische Auftrennung CHX-resistent markierter mitochondrialer Proteine nach Chromatographie an DNS-Cellulose: Insert: nach Coomassieblaufärbung große Abb.: Autoradiogramm

- A) Eluat in Gegenwart von cAMP
- B) Eluat nach Weglassen von cAMP
- C) 2 M KCl-Eluat

Man erkennt in der durch Weglassen von cAMP eluierbaren Fraktion vier Proteinbanden mit 26, 40, 46 und 56 kD Molekulargewicht. Bei CHX-resistenter Markierung erweist sich eine davon als radioaktiv, nämlich jene mit etwa 40 kD (vgl. Abb 19). Die restlichen drei müssen demzufolge cytoplasmatische Translationsprodukte sein, von denen eines (mit 46 kD) vermutlich mit dem im Photoaffinity Label markierbaren Protein identisch ist. Da sowohl der Kurvenverlauf des Scatchardplots der cAMP-Bindungskurven als auch der Photoaffinity Label auf ein Einkomponentensystem hinweisen, scheint es gerechtfertigt anzunehmen, daß die anderen drei Komponenten (also auch die mitochondrial synthetisierte) entweder unspezifisch oder aber als Komplex, also in irgendeiner Form mit der direkt bindenden Komponente assoziiert, von der Säule eluiert werden. In einem späteren Abschnitt wird sich zeigen, daß letzteres zumindest für das CHX-resistent markierbare Protein zutreffen könnte.

1.5.5. Spezifität der Bindung von cAMP/Protein-Komplexen an mitDNS

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß das cAMP-bindende Protein an mitDNS binden kann, daß diese Bindung offenbar durch cAMP erleichtert bzw. ermöglicht wird und daß gebundenes Protein bei Weglassen von cAMP im Puffer teilweise von der DNS abdissoziiert. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese cAMP-vermittelte Bindung an DNS ein statistischer Prozeß ist oder ob die Bindung vielmehr nur sequenzspezifisch an bestimmte DNS-Abschnitte erfolgt. Hierzu wurden Aliquots von gereinigtem mitochondrialem Protein mit gleichen Mengen an ^3H -cAMP versetzt, für 15 min mit definierten Mengen mitDNS aus verschiedenen rho⁻Petites, deren zurückbehaltene Information die verschiedensten Abschnitte der Wildtyp-DNS beinhalten (vgl. Abb.1) inkubiert und schließlich über NC-Filter abgesaugt. (Ein Ansatz ohne DNS diente als Blankwert). Die dann noch verbliebene Filter-gebundene Radioaktivität rührt ausschließlich von ^3H -cAMP/Protein/DNS-Komplexen (cAMP alleine hat keine Affinität zu Protein-freier DNS). Im Falle einer statistischen, also sequenzunspezifischen Bindung sollte in jedem Fall die gleiche Menge an Radioaktivität pro μg eingesetzter DNS gebunden werden, während andernfalls unterschiedliche Countwerte pro Filter ermittelt werden müßten. Die unten aufgeführte Tabelle (Tab. 13) zeigt das Ergebnis:

DNS aus	^3H -cAMP (cpm) gebunden (nach Berücksichtigung des Blanks)
---------	---

SM 202 (wildtyp)	490
A 14	525
G 1-11-4	455
1 C 6573	520
1 H 1261	595
HD 1	485
AS 1	770
C 45 P 1	480

Tab. 13: Bindung von ^3H -cAMP/Protein-Komplexen an DNS aus verschiedenen rho⁻Petites
Je 100 μg mit DNase verdautes mitochondriales Protein aus dereprimierten Zellen wurde mit 20 nCi ^3H -cAMP und 5 μg der jeweiligen mitDNS 15 min lang inkubiert und über NC-Filter abgesaugt.

Aus dem Ergebnis läßt sich erkennen, daß die Bildung von cAMP/Protein/DNS-Komplexen durch die Art der eingesetzten DNS beeinflußt wird, m.a.W. die Bindung scheint in gewissem Umfang von der Sequenz der DNS abzuhängen. Obgleich bei der NC-Filter-Technik mit einem gewissen experimentellen Fehler zu rechnen ist, kann man eine rein statistische Bindung wohl ausschließen, da sich in verschiedenen Versuchsansätzen die gleiche Tendenz ergab. Damit erscheint es gerechtfertigt, dieser Bindung auch in vivo eine Bedeutung beizumessen. Von den wichtigen, an der DNS ablaufenden Prozessen (Replikation, Transcription, Rekombination, Reparatur, Modifikation) ist zweifelsfrei die Transcription der geeignetste, die Genexpression rasch neuen Stoffwechselsituationen, wie sie z.B. bei Repression bzw. Derepression gegeben sind, anzupassen. Die in 1.4.2. beschriebene Experimente, nach denen cAMP die mitochondriale Transcription stimuliert, können also möglicherweise dahingehend erklärt werden, daß cAMP direkt mit einer an der Transcription beteiligten Komponente interagiert (z.B. Bindung an ein Genaktivator-Protein oder Bindung an eine Komponente der RNS-Polymerase).

2. DNS-bindende mitochondriale Translationsprodukte

Faßt man das erste Hauptkapitel zusammen, so bleibt festzuhalten: Hefemitochondrien besitzen ein hoch-affines, hoch-spezifisches System zur Erkennung von cAMP. Da cAMP/Protein-Komplexe in Assoziation mit mitDNS gefunden werden und gleichzeitig eine Beeinflussung der mitochondrialen Transcription durch cAMP gezeigt werden konnte, scheint es naheliegend, die biologische Funktion des cAMP-Rezeptorsystems in einer Transcriptionsregulation zu suchen, wenngleich andere (zusätzliche) Funktionen nicht ausgeschlossen werden können. Wegen der Korrelation zwischen cAMP-Spiegel und Konzentration an vergärbaren Substraten hätten Hefemitochondrien mit diesem System ebenso wie etwa E. coli die Möglichkeit, ihre Genexpression rasch den veränderten Gegebenheiten anzupassen.

Das zweite Hauptkapitel der vorliegenden Arbeit widmet sich einem Aspekt, der ebenfalls unter dem Gesichtspunkt "Regulation der mitochondrialen Genexpression" zu sehen ist, nämlich der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte, der

Frage also, ob und welchen Beitrag der mitochondriale Syntheseparat selbst zur Regulation der Genexpression in den Mitochondrien leistet.

2.1. Nachweismethoden

Die Befähigung mitochondrialer Translationsprodukte, an DNS zu binden (ohne Berücksichtigung eines möglichen Einflusses von cAMP!), wurde bislang auf drei verschiedene Arten gezeigt (Rüdel, 1977 a + b): a) Bindung an einzelsträngige DNS, die nach der Methode von Gillespie und Spiegelman (1965) an NC-Filter gebunden wurde; b) Isolation bindender Proteine aus "dirty DNA" (= weder mit Proteasen noch mittels Phenolisierung nachgereinigte DNS)-Präparationen mittels NaJ-Dichtezentrifugation; c) Isolation bindender Proteine auf Grund ihrer Affinität zu DNS-Cellulose. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun noch ein zusätzlicher Test durchgeführt, nämlich die Bindung von dsDNS/Protein-Komplexen an NC-Filter (Jones, 1966). Ähnlich wie bei a) zeigte sich auch hier eine deutliche Beeinflussung der Bindung durch Mg^{++} - sowie Mn^{++} -Ionen. (Abb. 20)

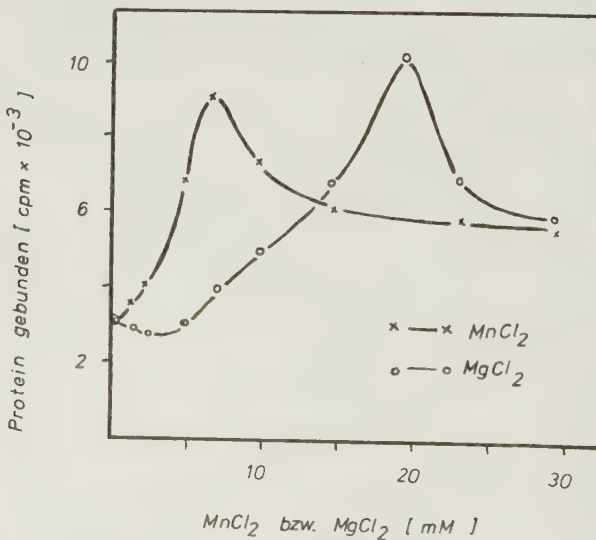


Abb. 20: Abhängigkeit der Bildung von DNS/Protein-Komplexen von Mn^{++} - sowie Mg^{++} -Ionen
Je Meßpunkt wurden 100 μg CHX-resistent markiertes Protein mit 5 μg mitDNS (wt) bei den angegebenen Ionenkonzentrationen inkubiert und über NC-Filter abgesaugt.
Ordinate: gebundene Radioaktivität pro Filter

2.2. DNS-bindende, mitochondriale Translationsprodukte aus anaerob gewachsenen Zellen

Da bereits geklärt wurde, daß die Wachstumsbedingungen entscheidenden Einfluß auf den Anteil DNS-bindender Proteine unter den mitochondrialen Translationsprodukten hat (erhöhte Bindung bei reprimierten gegenüber dereprimierten Zellen, Rödel, 1977 b), war es von Interesse, den gleichen Sachverhalt unter anaeroben Bedingungen zu untersuchen. Hierzu wurden Zellen wie unter Methoden beschrieben (5.6.1.2.) anaerob gezüchtet und in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ radioaktiv markiert. Die isolierten mitochondrialen Partikel wurden solubilisiert und auf eine DNS-Cellulose-Säule appliziert. Nicht bindendes Material wurde durch extensives Waschen mit 50 mM KCl-Puffer entfernt, bindende Proteine wurden mit einem 2 M KCl-Puffer eluiert. Parallel dazu wurden entsprechend markierte Proben aus aerob gewachsenen Zellen untersucht. Die nachstehende Tabelle (Tab. 14) summiert das Ergebnis:

Wachstumsbedingung	cpm im 50 mM KCl-Eluat	cpm im 2 M KCl-Eluat	% DNS- bindende mit. Trans- lationspro- dukte
aerob, Glycerin	1287400	773	0.06
aerob, 10 % Glucose	1004950	1480	0.15
anaerob, 10 % Glucose	1730370	2940	0.17

Tab. 14: Vergleich der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte aus aerob bzw. anaerob gewachsenen Zellen

Aus Wildtypzellen (SM 202), die anaerob bzw. aerob mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Gegenwart von CHX markiert waren, wurden Mitochondrien isoliert und nach Solubilisierung und DNase-Verdauung an DNS-Cellulose chromatographiert. Bindende Proteine wurden mit 2 M KCl eluiert.

Glucoserepression bewirkt einen Anstieg der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte von 0.06 auf 0.15 %, also etwa einen Faktor von 2.5. Vergleicht man hingegen die bindenden

Proteine aus aerob bzw. anaerob in Gegenwart von 10 % Glucose gewachsenen Zellen (0.15 % bzw. 0.17 %), so zeigt sich, daß zusätzlich zum Repressionseffekt ein ausgeprägter Anaerobiosiseffekt hinsichtlich der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte nicht festzustellen ist.

2.3. Prüfung der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte auf Sequenzspezifität

Die vorstehend beschriebene DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte kann artifiziell (sequenzunspezifisch) sein. Ihr kann aber auch eine strukturelle und/oder regulatorische Rolle zukommen. Bei Proteinen mit struktureller Funktion ist in der Regel die Sequenzspezifität der Bindung wenig ausgeprägt (vgl. Histone). Im Gegensatz dazu können regulatorische Proteine nur dann eine biologische Rolle spielen, wenn sie zwischen Sequenzen auf der DNS unterscheiden können. Eine Untersuchung, ob Proteine an jede DNS gleichermaßen binden oder ob das Ausmaß der Bindung durch die Wahl der eingesetzten DNS beeinflusst wird, kann also zum Verständnis der Rolle dieser Proteine beitragen.

Um die Sequenzspezifität der Bindung zu prüfen, wurden solubiliisierte mitochondriale Proteine aus reprimierten Wildtyp-Zellen, die in Gegenwart von CHX radioaktiv markiert waren, mit mitDNS aus verschiedenen rho⁻Petites inkubiert und anschließend über NC-Filter abgesaugt. Nach Berücksichtigung der Blankwerte (= Proteinbindung ohne DNS) ergab sich folgendes Bild (Tab. 15). Das Ergebnis zeigt, daß die Art der angebotenen DNS einen großen Einfluß auf das Ausmaß der Proteinbindung hat (wenngleich die Signifikanz wegen der geringen absoluten Countzahlen (max. 5×10^2 cpm) nicht groß ist). Dennoch spricht die sich abzeichnende unstatistische Bindung dafür, daß es sich nicht um zufällige Protein/DNS-Aggregationen handelt. Eine Entscheidung darüber, ob es sich um Proteine mit sequenzspezifischen strukturellen Aufgaben oder um solche mit regulatorischen und/oder enzymatischen Funktionen handelt, kann auf der Grundlage dieses Versuchs nicht gefällt werden, zumal ja die beobachtete Bindung durchaus über weitere Proteine vermittelt sein könnte.

DNS aus⁺

Bindung relativ zu wt SM 202 (= 100 %)

SM 202 (Wildtyp)	100
A 14	58
C 45 P1	200
HD 1	116
1 H 1261	54
AS 1	120
1 C 6573	0
G 1-11-4	112

Tab. 15: Bindung CHX-resistent markierter mitochondrialer Proteine an DNS aus verschiedenen rho⁻Petites

Je 5 µg Protein (2×10^4 cpm/µg) wurden mit je 5 µg mitDNS eines jeden Stammes 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über NC-Filter abgesaugt. Die Bindungsraten wurden auf den Wildtyp SM 202 = 100 % bezogen.

+ Zurückbehaltene Region: vgl. Abb.1

Interessant erscheinen mir die Daten der Stämme 1 H 1261, 1 C 6573 sowie C 45 P 1: wie aus der genetischen Karte (Abb. 1) zu entnehmen ist, beinhaltet der erstgenannte Stamm die beiden anderen, ohne daß sich letztere überlappen. Während der eine (1 C 6573, t-RNS-Region) keine Bindung zeigt, findet sich beim anderen (C 45 P 1, oxi 1-Region) die höchste aller getesteter DNS. Der Stamm 1 H 1261, der ja die Bindungsstelle(n) der C 45 P 1-DNS ebenfalls beinhaltet, wenngleich in wesentlich geringerer Konzentration, zeigt insgesamt einen recht geringen Wert (54 % des Wildtyps). Man muß sich dabei vor Augen halten, daß das Ergebnis der Bindung stets einen Mittelwert für die eingesetzte DNS darstellt. Bei detaillierten Untersuchungen wären im Idealfall extrem kleine rho⁻Petites (mit weniger als 100 bp) einzusetzen, die in ihrer Gesamtheit die mitDNS vollständig abdecken und deren zurückbehaltene DNS-Sequenz in jedem Einzelfall genau kartiert und charakterisiert sein müßte.

2.4. Bindet Subunit III der Cytochromoxidase an mitDNS ?

Bei SDS-gelelektrophoretischer Untersuchung der an mitDNS bindenden Polypeptide finden sich - wie aus den vorstehend geschilderten Versuchsergebnissen zu vermuten war - CHX-resistent markierbare Komponenten, im wesentlichen eine mit einem M_r von etwa 24 kd (vgl. Rödel, 1977 a). Im Folgenden wird nun der Frage nachgegangen, ob es sich dabei um die mitochondrial synthetisierte su III der Cytochromoxidase handelt, deren Molekulargewicht in der Literatur mit 22 - 24 kd angegeben wird (Cabral et al., 1976; Saltzgaber-Müller & Schatz, 1978).

2.4.1. Coelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel

An mitDNS bindende Proteine wurden aus in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierten Zellen als DNS/Protein-Komplexe mittels NaJ-Dichte-zentrifugation gewonnen, dialysiert, mit DNase verdaut und in 10 bzw. 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen parallel zu CHX-resistent markierten mitochondrialen Gesamtproteinen aus den gleichen Zellen aufgetrennt. Stets war die Wanderungsstrecke des fraglichen Proteins mit der von su III der Cytochromoxidase deckungsgleich. Abb. 21 zeigt das Autoradiogramm und das entsprechende Densitogramm eines solchen Gels. Unter den gewählten Elektrophoresebedingungen ist es demnach nicht möglich, die beiden Komponenten auf Grund eines möglichen M_r -Unterschiedes zu trennen.

2.4.2. SDS-Gelelektrophorese nach partieller Proteolyse

Das sogenannte "peptide mapping", d.h. begrenzte Proteolyse eines Polypeptids mit einer spezifischen Protease und nachfolgender Auftrennung der Peptidfragmente im SDS-Polyacrylamidgel nach dem Molekulargewicht (Cleveland, 1977) stellt eine rasche und relativ einfache Methode dar zur Abklärung von Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Proteine. Im vorliegenden Fall wurden die beiden zu vergleichenden Proteinbanden nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel aus dem Gel herausgeschnitten, nach Thorell & Johansson (1971) iodiert und mit Chymotrypsin partiell verdaut. Anschließend

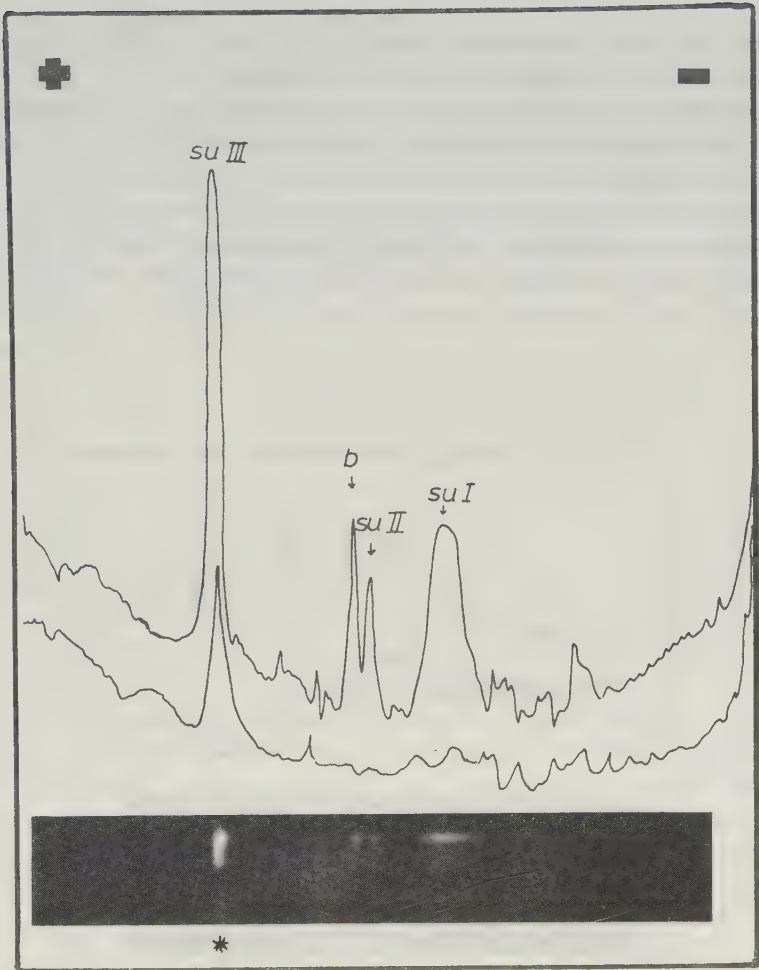


Abb. 21: Coelektrophorese von CHX-resistent markierten mitochondrialen Proteinen und einem mitochondrialen Translationsprodukt, das mit mitDNS assoziiert ist.

unten: Autoradiogramm des SDS-Gels, und zwar in der oberen Spur gesamt-mitochondriales Protein, in der unteren Spur das DNS-bindende Protein
oben: entsprechende Densitogramme
Der Stern kennzeichnet die Position des fraglichen Polypeptids.

wurden die resultierenden Fragmente in einem zweiten SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 22 zeigt das Autoradiogramm eines Geles, in dem parallel zu III der Cytochromoxidase und das 24 kd Protein aus mitDNS-Präparationen nach Cleveland-Digest aufgetrennt wurden. Die Sterne kennzeichnen Banden gleicher Laufpositionen. Man erkennt eine ganze Reihe von Banden gleichen Molekulargewichts, was den Schluß zuläßt, daß es sich bei den Proteinen zumindest um verwandte, wenn nicht identische Polypeptide handelt.

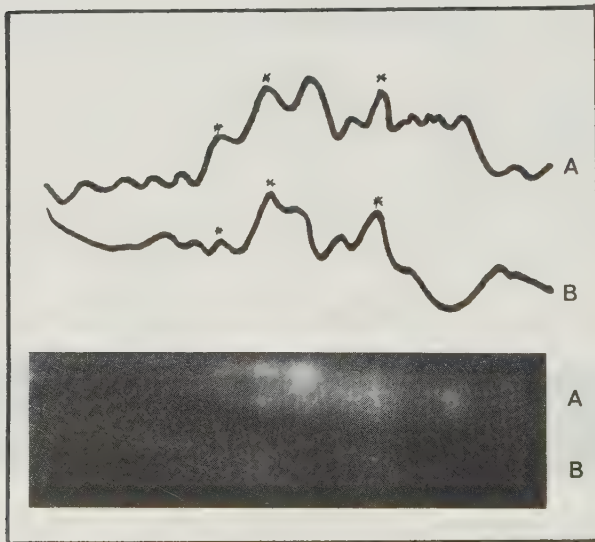


Abb. 22: Partielle Proteolyse mit Chymotrypsin von jodierter su III der Cytochromoxidase (obere Spur) bzw. des 24 kd Polypeptids mit DNS-bindenden Eigenschaften (untere Spur): Autoradiogramm und dazugehörige Densitogramme. Die Sterne kennzeichnen peaks an gleichen Positionen. Laufrichtung: von links nach rechts. (Die Unschärfe der Banden im Autoradiogramm rührt von der großen Streustrahlung von $^{125}\text{J}^-$)

2.4.3. Immunologische Untersuchungen

Durch Bereitstellung von spezifischen Antisera gegen die Untereinheiten I, II und III der Cytochromoxidase sowie gegen Apocytochrom b, den gesamten bc_1 -Komplex und F_1 -ATPase durch Professor Schatz (Biozentrum Basel) war es möglich, die Frage der Identität DNS-bindender Proteine mit bekannten Untereinheiten der Atmungskette mit immunologischen Methoden anzugehen. Hierzu wurde eine Kalbsthymus-DNS-Cellulose-Säule mit solubilisierten mitochondrialen Proteinen beschickt und mit steigenden Salzkonzentrationen eluiert (vgl. Methoden 5.11.). Die jeweiligen Fraktionen wurden gepoolt, dialysiert, eingengt und im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1965) auf ihre Antigenizität mit den jeweiligen Antisera untersucht. Tab. 16 gibt einen Überblick über die dabei erzielten Ergebnisse.

Man erkennt, daß su III der Cytochromoxidase als einzige der untersuchten Komponenten im 2 M KCl-Eluat eine eindeutige positive Reaktion zeigt. Dieses Ergebnis und die unter 2.4.1. bis 2.4.3. getroffenen Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß su III eine Affinität zu DNS besitzt. Dieser Befund ist einigermaßen überraschend, da bekannt ist, daß dieses Protein seine (bisher einzige bekannte) Funktion als Bestandteil der Cytochromoxidase in membrangebundener Form ausübt. Seine vermutliche Lokalisierung in der Membran, nämlich an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran (Dockter et al., 1978), sein Löslichkeitsverhalten (Poyton & Schatz, 1975) sowie die Nukleotidsequenzdaten der oxi 2-Region (Thalenfeld & Tzagoloff, 1980) weisen es als ein sehr hydrophobes Protein (isoelektrischer Punkt etwa 5.2) aus, Kriterien, die eher gegen DNS-affine Eigenschaften sprechen. Demgegenüber ist aber z.B. für den lac-Repressor bekannt, daß auch dieses Protein (dessen ausschließliche Funktion in der DNS-Bindung liegt) über ausgedehnte hydrophobe Bereiche verfügt (Bourgeois & Pfahl, 1976); ferner zeigen die Nukleotidsequenzdaten der oxi 2-Region von Thalenfeld und Tzagoloff (1980) am N-terminalen Ende etliche basische Aminosäuren, die ja eine ideale Voraussetzung für DNS-Bindung bieten. Wie bereits erwähnt, schließen die vorliegenden Daten nicht aus, daß die beobachtete Bindung an L4S

Antiserum gegen Fraktion	F ₁ -ATPase	Cytochrom b ₅ (Apoprotein)	bc ₁ -Komplex	Holocyto- chromoxidase	Cytochromoxidase su I su II su III
Gesamt-mito- chondriales protein	+	+	+	+	+
50 mM KCl- Eluat	+	+	+	+	+
500 mM KCl- Eluat	-	-	-	+	(+)
2 M KCl- Eluat	-	-	-	+	(+)
Kontroll- serum	-	-	-	-	-

Tab. 16: Übersicht über die immunologischen Reaktionen mitochondrialer Proteine nach

Fraktionierung über eine DNS-Cellulose-Säule

Mitochondrien aus reprimierten Wildtypzellen (SM 202) wurden solubilisiert und wie im Methodenteil (5.11.) beschrieben über eine DNS-Cellulose-Säule fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1965) auf ihre Antigenizität gegenüber den in der obersten Zeile genannten Antisera untersucht.

- keine Präzipitationslinie sichtbar

(+) Präzipitationslinie sehr schwach sichtbar

+ Präzipitationslinie deutlich sichtbar

in irgendeiner Form vermittelt wird, sei es über ein zweites Polypeptid oder aber über einen hydrophilen Aminosäureabschnitt eines bislang noch hypothetischen Precursors, wie er z.B. bei Neurospora crassa jüngst für die mitochondrial synthetisierten su I und II der Cytochromoxidase sowie für eine Reihe cytoplasmatisch synthetisierter mitochondrialer Proteine gezeigt wurde (Machleidt & Werner, 1980; Hennig et al., 1980; Werner et al., 1980).

2.4.4. Weitere DNS-bindende mitochondriale Translationsprodukte

Die bislang vorliegenden Daten zeigen, daß su III der Cytochromoxidase DNS-bindende Eigenschaften besitzt. Im Folgenden soll geklärt werden, ob es daneben noch weitere mitochondriale Translationsprodukte gibt, die an DNS binden. Hierzu wurde folgendes Experiment durchgeführt: Mitochondriales Protein aus CHX-resistent markierten reprimierten Zellen wurde mit Antiserum gegen su III der Cytochromoxidase behandelt (der quantitative Ausfall von su III wurde durch elektrophoretische Auftrennung der nicht präzipitierten Proteine im SDS-Polyacrylamidgel gezeigt; ohne Abb.) und anschließend im NC-Filtertest (s. Methoden 5.10.3) auf die Befähigung, mit mitDNS Komplexe zu bilden, untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß trotz des Fehlens von su III noch ein gewisses Ausmaß (etwa 40 %) an Bindung feststellbar war. Su III der Cytochromoxidase stellt damit zwar die Hauptmasse, aber nicht die alleinige Komponente der DNS-bindenden mitochondrialen Translationsprodukte dar. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den unter 1.5.4. beschriebenen Ergebnissen, denen zufolge ein mitochondriales Translationsprodukt von 40 kd (su III: 24 kd) in Gegenwart von cAMP an DNS-Cellulose gebunden, bei Weglassen von cAMP im Elutionspuffer jedoch eluiert wird. Auf Grund dieses Befundes würde man für die Bindung mitochondrialer Translationsprodukte, nicht aber von su III der Cytochromoxidase an DNS eine Beeinflussung durch cAMP erwarten. In den beiden folgenden Versuchen wird diese Vorhersage experimentell geprüft.

2.4.5. cAMP-Stimulierbarkeit der Bindung mitochondrialer Translationsprodukte an mitDNS und Prüfung der Sequenzspezifität der Stimulation

In Abschnitt 1.5.4. wurde gezeigt, daß ein CHX-resistent markierbares Protein mit etwa 40 kd in Abwesenheit von cAMP von DNS-Cellulose eluierbar ist. Da dieses Protein im Photoaffinity Label (1.2.9.) nicht markierbar ist, wurde die Vermutung geäußert, daß es nicht direkt cAMP bindet, sondern möglicherweise mit dem cAMP-bindenden Protein assoziiert vorliegt.

Im folgenden wird untersucht, ob sich die DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte durch cAMP erhöhen läßt. Hierzu wurden je 100 µg radioaktiv markiertes mitochondriales Protein aus in Galactose gewachsenen Zellen zusammen mit je 5 µg einer bestimmten mitDNS in Gegenwart oder Abwesenheit von extern zugesetztem cAMP inkubiert und über NC-Filter abgesaugt. (s. Methoden 5.10.3.). In Tabelle 17 ist das Ergebnis zusammengefaßt, wobei sich der Stimulationsfaktor aus dem Quotienten aus (Bindung + cAMP)/(Bindung ohne cAMP) errechnet.

DNS aus	Stimulation der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte durch cAMP
SM 202 (Wildtyp)	1.7
A 14	2.1
C 45 P1	3.5
HD 1	2.5
1 H 1261	6.4
1 C 6573	1.0
AS 1	1.0
G 1-11-4	1.0

Tab. 17: Stimulation der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte durch cAMP (10 µM) in vitro
 Je 100 µg CHX-resistent markiertes mitochondriales Protein wurde mit je 5 µg mitDNS aus den aufgeführten Stämmen mit und ohne cAMP inkubiert und über NC-Filter abgesaugt. Aus der Filter-gebundenen Radioaktivität wurde der Stimulationsfaktor ermittelt.

Man erkennt, daß bei einigen der eingesetzten DNS' eine zum Teil beachtliche Stimulation erzielt wird, während bei anderen kein Effekt zu beobachten ist. Ein Vergleich mit Tab. 13 zeigt, daß die Bildung von Protein/cAMP/DNS-Komplexen mit bestimmten mitDNS' weder automatisch eine Bindung mitochondrialer Translationsprodukte nach sich zieht (s. Stamm 1 C 6573) noch - im Falle einer solchen Bindung - deren Stimulation durch cAMP.

2.4.6. Wird die Bindung von su III der Cytochromoxidase an DNS durch cAMP beeinflusst ?

Hierzu wurde mit mitDNS aus dem Stamm 1 H 1261, bei der die cAMP-stimulierte Bindung mitochondrialer Translationsprodukte besonders deutlich ausgeprägt war, die cAMP-Stimulation vor und nach Titration der mitochondrialen Proteine mit Antiserum gegen su III untersucht. (Ausgedehntere Untersuchungen waren wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge an Antiserum leider nicht möglich).

Wie aus Tab. 18 hervorgeht, geht der stimulierende Effekt durch cAMP nach der Titration nicht verloren, sondern tritt im Gegenteil sogar deutlicher zutage.

Protein	cpm bound/Filter		Stimulationsfaktor durch cAMP
	+ cAMP	- cAMP	
untitriert	420	80	5.3
mit Anti- su III titriert	320	40	8.0

Tab. 18: Bindung mitochondrialer Translationsprodukte an mitDNS des Stammes 1 H 1261 (5 µg pro Ansatz) vor und nach Titration mit Antiserum gegen su III der Cytochromoxidase. Pro Ansatz wurden 10^5 cpm Protein eingesetzt.

Die beobachtete Stimulation der DNS-Bindung mitochondrialer Translationsprodukte durch cAMP wird damit nicht durch su III verursacht, sondern durch ein anderes CHX-resistent markierbares Protein, eventuell das unter 1.5.4. beschriebene mit 40 kd. Die Bindung von su III an mitDNS scheint durch cAMP nicht beeinflusst zu werden.

Damit möchte ich den zweiten Hauptabschnitt der Arbeit, der sich mit DNS-bindenden mitochondrialen Translationsprodukten beschäftigte, abschließen und mich dem letzten Kapitel zuwenden, das die letzte noch offene der in der Einleitung formulierten Fragen aufgreift, nämlich jene, ob mitochondrial synthetisierten Proteinen im Partnersystem Kern/Cytoplasma eine Signalübermittlerfunktion zukommen könnte.

3. Fungieren mitochondriale Translationsprodukte als Signale außerhalb der Mitochondrien ?

Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es zahlreiche Hinweise auf eine enge Wechselbeziehung zwischen dem nucleo-cytoplasmatischen und dem mitochondrialen System hinsichtlich der mitochondrialen Regulation. In einigen Arbeiten werden dabei Modelle vorgeschlagen, denen zufolge mitochondriale Translationsprodukte im nucleären System regulatorisch eingreifen sollen (Puglisi & Algeri, 1970; Zennaro et al., 1977; Sanders et al., 1973; Barath & Küntzel, 1972 a + b; Rouslin, 1976; Beauchamp & Gross, 1976). Durch die Möglichkeit, mitochondriale Translationsprodukte spezifisch radioaktiv zu markieren (Clark-Walker & Linnane, 1966; Sisler & Siegel, 1967), ist dieser Sachverhalt experimentell prüfbar.

3.1. Lassen sich mitochondriale Translationsprodukte in isolierten Kernen nachweisen ?

Markiert man Hefezellen mit ^3H -Adenin und anschließend in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$, lysiert die enzymatisch gewonnenen Protoplasten und trennt die DNA's mittels NaJ-Dichte-zentrifugation auf, so ergibt sich für die resultierenden Banden ein charakteristisches $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ -Verhältnis. Ein Beispiel ist in Abb. 23 dargestellt.

Man erkennt, daß sich nicht nur in der mitDNS-Bande, sondern auch - wenn auch deutlich verringert - im Bereich der nucDNS sowie der 2 μm -DNS CHX-resistent markiertes Material nachweisen läßt. Dieses Ergebnis läßt es offen, ob diese Radioaktivitätsverteilung den in vivo Zustand widerspiegelt oder das Er-

gebnis eines Präparationsartefakts ist (der z.B. darauf beruht, daß während der Lyse bindendes Material in Kontakt mit nucDNS bzw. 2 μ m DNS kommt).

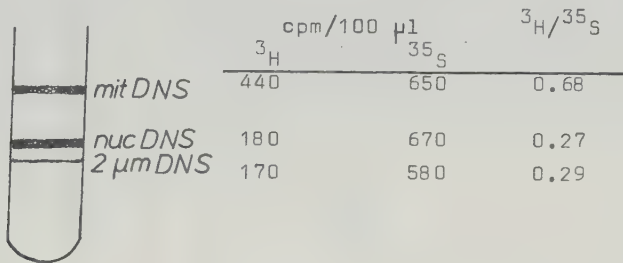


Abb.23 : Radioaktivitätsverteilung in einem NaJ-Gradienten. Mit ^3H -Adenin vormarkierte Wildtypzellen (SM 202) (in YPGal) wurden in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ markiert. Bei der DNS-Präparation (vgl. Methoden), ergab sich im NaJ-Gradient die links schematisch dargestellte Bandenverteilung. In einem Aliquot jeder der entnommenen Banden wurde die durch ^3H bzw. ^{35}S hervorgerufene Radioaktivität bestimmt.

Wenn es sich bei der beobachteten Bindung von CHX-resistent markiertem Material im Bereich der nucDNS um ein in vivo Phänomen handelt, so sollte unter den obigen Markierungsbedingungen ^{35}S -markiertes Material in intakten Kernen nachweisbar sein. Voraussetzung für die Beantwortung dieser Fragestellung ist es, Kerne frei von jeglicher Kontamination durch mitochondriale Proteine darzustellen. Wie schwierig diese Aufgabe ist, läßt sich aus Abb. 24 entnehmen: Bei dem dort dargestellten Versuch wurden mit ^3H -Adenin markierte Zellen eines rho^0 -Stammes mit solchen eines rho^+ -Stammes, der in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ markiert wurde, gemischt und zusammen aufgearbeitet. Man erkennt, daß eine Dichte-zentrifugation im Urographingradienten nicht ausreicht, um ^3H - und ^{35}S -Radioaktivität sauber voneinander zu trennen, m.a.W. diese und auch eine ganze Reihe weiterer getesteter Kernpräparationsmethoden (Bhargava & Halvorson, 1971; Rozijn & Tonino, 1964; Duffus, 1975; Wintersberger, 1974) erweisen sich als untauglich, Kerne völlig frei von mitochondrialer Kontamination darzustellen. Erst eine Kombination verschiedener Methoden, dargestellt in Abb. 25, führte zu kontaminationsfreien Kernpräparationen.

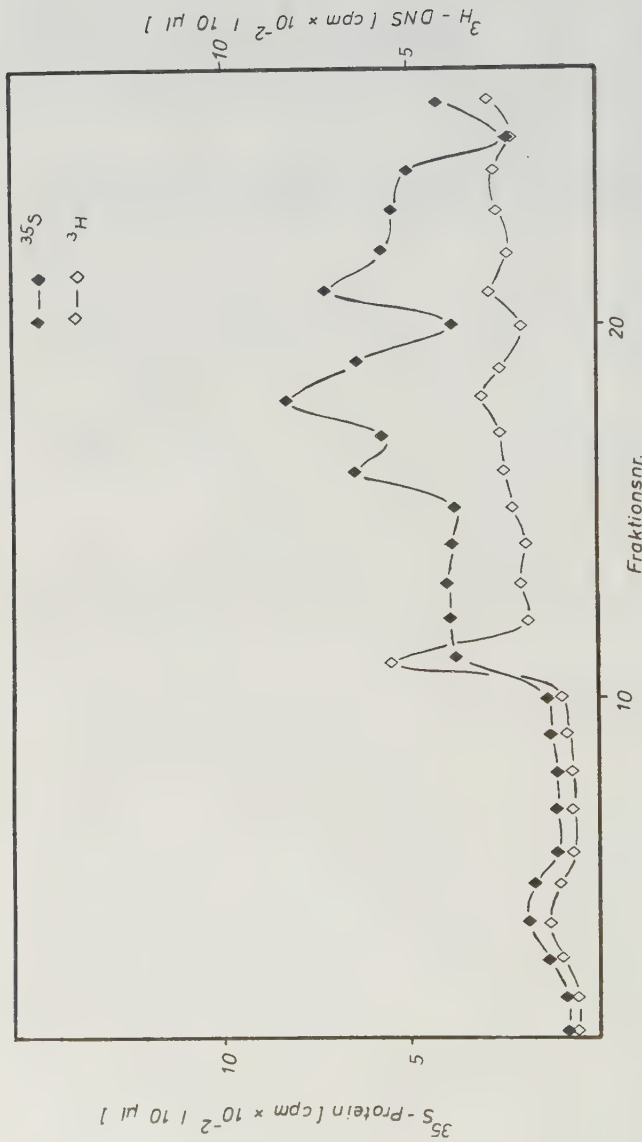


Abb. 24: Verteilung TCA-fällbarer Radioaktivität in einem Urographingradienten (Stufen: 25 %/35 %/45 %/60 %). Rho⁰-Zellen (K14-4 A rho⁰), mit $3H$ -Adenin markiert, wurden mit rho⁺-Zellen (SM 202) (mit $35S$) in Gegenwart von CHX markiert) gemischt und gemeinsam aufgeschossen. Das Zellsat wurde auf einen Urographingradienten aufgeschichtet, nach Zentrifugation (s Stunden, 27000 rpm, SW 27-Rotor, Beckmann) fraktioniert und in je einem Aliquot der einzelnen fraktionen die Radioaktivität ($3H/35S$ -Doppelmessung) bestimmt. Kerne reichern sich zwischen 45 und 60 % Urographin an (Fraktion 11). Fraktion 1 = bottom Fraktion 26 = top

B

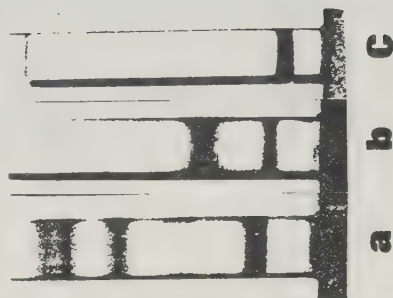
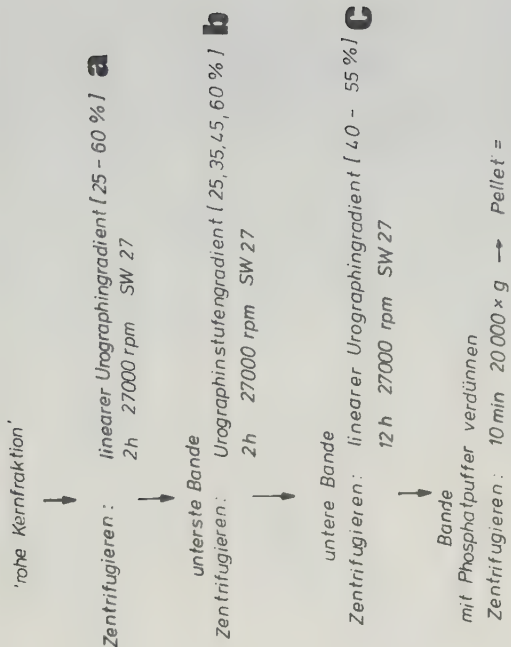


Abb. 25: Schematische Darstellung der Isolation Mitochondrien-freier Zellkerne

Isoliert man nun Kerne nach der in Abb. 25 dargestellten Methode aus rho⁺-Zellen, bei denen gleichzeitig mit ³H-Adenin und - in Gegenwart von CHX - mit ³⁵SO₄²⁻ markiert wurde, so ergibt sich im letzten Zentrifugationsschritt (B/c) folgende Radioaktivitätsverteilung (Abb.26):

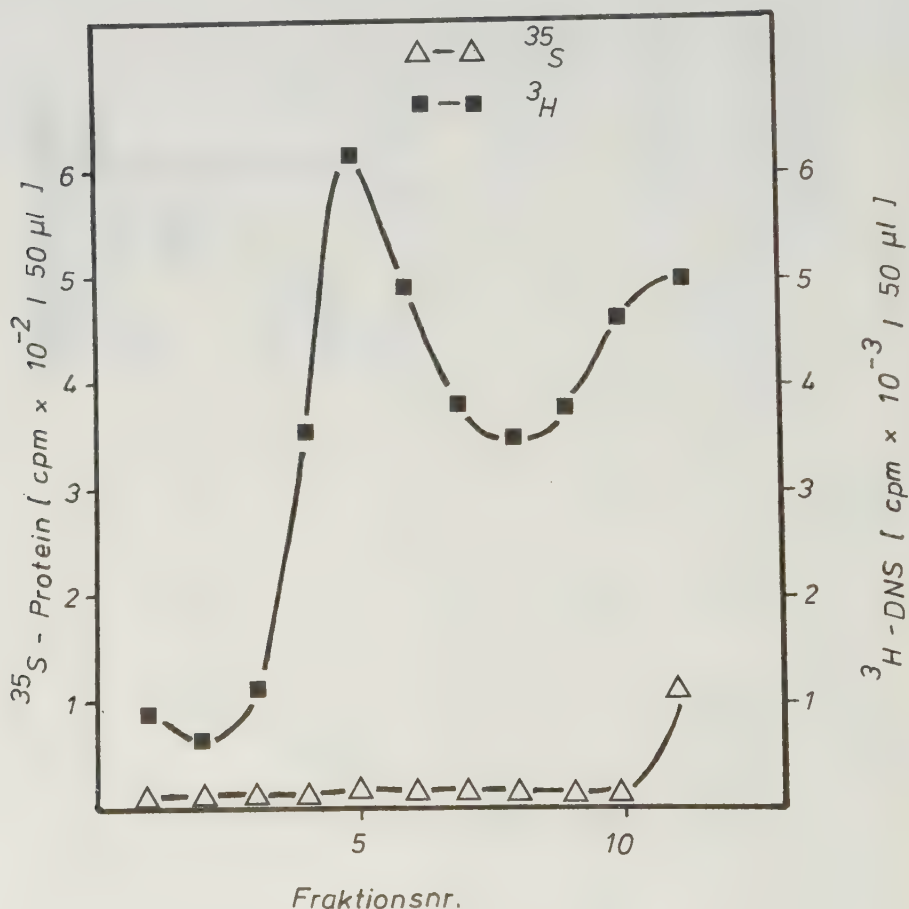


Abb. 26 : Radioaktivitätsverteilung doppelmarkierter Zellen im letzten Zentrifugationsschritt (=B/c in Abb. = linearer Urographingradient von 40 bis 55 % Urographin) zur Isolation Mitochondrien-freier Kerne.
Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Das Ergebnis besagt, daß sich unter den gewählten Präparations- und Markierungsbedingungen kein mitochondriales Translationsprodukt in Kernen nachweisen läßt. Der Einwand, es könne sich um ein Polypeptid ohne S-haltige Aminosäure handeln (d.h. es wäre mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ nicht markierbar), kann entkräftet werden durch entsprechende Versuche mit ^3H -Aminosäuregemischen und ^{14}C -Adenin, die das gleiche Resultat ergeben. Das einzige Argument, das sich nicht widerlegen läßt, wäre, daß das Protein in einer solch geringen Konzentration vorliegt, daß es unter die Nachweisgrenze fällt, die in der Größenordnung von etwa 300 cpm/Proteinbande liegen dürfte.

3.2. Lassen sich mitochondriale Translationsprodukte in der Zellmembran nachweisen ?

Die eben geschilderten Ergebnisse zeigen, daß der Zellkern als Sitz eines der beiden an der mitochondrialen Biogenese beteiligten genetischen Systeme aller Voraussicht nach keine Signale/Signalübermittler in Form eines mitochondrialen Translationsproduktes erhält. Demnach wären die oben zitierten Vorstellungen eines mitochondrial synthetisierten Repressormoleküls im Kern nicht haltbar.

Es bleibt aber immer noch die Möglichkeit, daß mitochondriale Translationsprodukte außerhalb des Zellkerns in das nucleocytoplasmatische System eingreifen. Ergebnisse von Bandlow (persönliche Mitteilung), denen zufolge die mitochondriale tsm 8-Mutation zu einer Verzögerung der Derepression der Adenylatcyclaseaktivität führt, ferner von Evans et al. (1976), nach denen mitochondriale Mutationen die Aufnahme von Galactose in die Zellen beeinflussen, könnten dahingehend interpretiert werden, daß einem mitochondrialen Translationsprodukt in der Zellmembran eine steuernde Funktion zukommt. Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob sich mitochondriale Translationsprodukte in der Zellmembran nachweisen lassen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein ähnlicher Versuchsansatz gewählt, wie er unter 3.1. beschrieben wurde.

Aus Hefezellen, die in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ radioaktiv markiert worden waren, wurde mittels differentieller Zentrifugation (s. Methoden, Abb. 2) die S-100-Fraktion isoliert, in welcher sich Plasmamembranfragmente anreichern (Kriterium: Leitenzyme wie Invertase, saure Phosphatase, Oligomycin-insensitive ATPase (pH 4.5)). Das resultierende S-100-Pellet wird für zwei weitere Stunden in einem linearen Urographingradienten (10 % bis 35 %) zentrifugiert (SW 27-Rotor, Beckmann, 27000 rpm). Bei der anschließenden Fraktionierung ergab sich die in Abb. 27 dargestellte Radioaktivitätsverteilung.

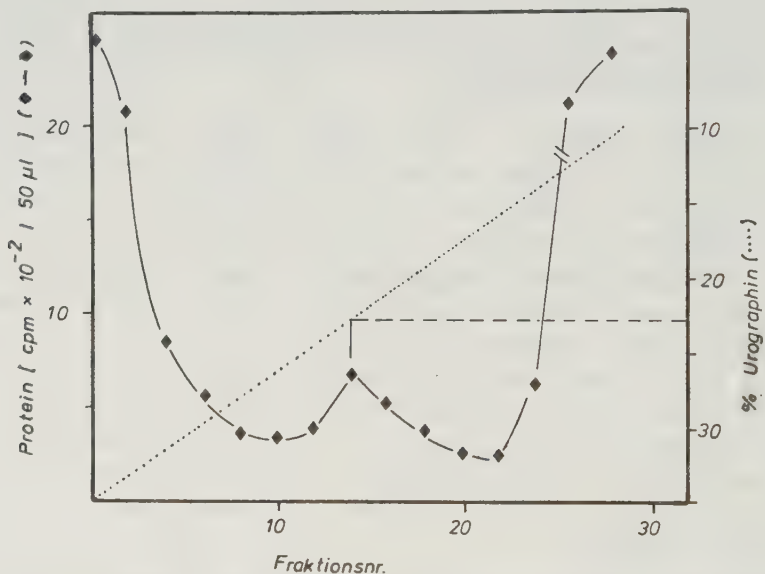


Abb. 27: Radioaktivitätsverteilung im Urographindichtegradienten
Aus in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierten Zellen (SM 202, YPGal) wurde die cytoplasmatische S-100-Fraktion isoliert und in einem linearen Urographingradienten (10 bis 35 %) fraktioniert. In einem Aliquot jeder Fraktion wurde die Radioaktivität bestimmt.

Man erkennt, daß sich der größte Teil der Radioaktivität am oberen und unteren Ende des Gradienten nachweisen läßt. Der dichtere, pelletierende Anteil dürfte v.a. auf mitochondrialen Partikeln beruhen, während der oben schwimmende Anteil mit der geringeren Dichte auf freie, nicht eingebaute Radioaktivität

sowie lösliche Proteine zurückzuführen sein dürfte. Deutlich zu sehen ist aber darüberhinaus im Bereich von 22 bis 23 % Urographin (entsprechend einer Dichte von etwa 1.164 g/cm^3) ein kleiner Radioaktivitätspeak. Dies entspricht genau dem Dichtebereich, in dem die Cytoplasmamembran bandiert (Leitenzyme! s.o.). Bei SDS-Polyacrylamid-gelelektrophoretischer Auftrennung dieser Fraktion und anschließender Autoradiographie resultiert das in Abb. 28 dargestellte Bandenmuster (b; in der Parallelspur a wurde gesamt-mitochondriales Protein nach Markierung in Gegenwart von CHX aufgetrennt). Man erkennt eine einzige Bande, deren Molekulargewicht sich zu etwa 17 kd errechnet. Der in Abb. 27 zu beobachtende Radioaktivitätspeak kann also einem einzigen Polypeptid zugeordnet werden und beruht nicht auf einer unspezifischen Affinität von Membranproteinen zu freiem $^{35}\text{SO}_4^{--}$.

Einen Beweis für das Vorkommen eines mitochondrialen Translationsproduktes in der Zellmembran liefert der eben geschilderte Versuch allein noch nicht, denn die Möglichkeit eines post-transcriptionalen, d.h. Ribosomen-unabhängigen Sulphateinbaues in Proteine wurde bislang nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde die Markierbarkeit/Nicht-Markierbarkeit des fraglichen Proteins mit $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Aminosäuren experimentell getestet.

Nach Markierung mit ^3H -Aminosäuremix in Gegenwart von CHX wurden wie oben beschrieben Plasmamembranen isoliert und bezüglich ihrer Radioaktivitätsverteilung im Urographingradienten untersucht. Im Falle der ^3H -Markierung läßt sich weder im Urographingradienten im Dichtebereich der Plasmamembran noch im SDS-Polyacrylamidgel der entsprechenden fraktion radioaktives Material nachweisen.

Ein weiteres Kriterium dafür, daß es sich bei dem oben beschriebenen radioaktiven Produkt um eine post-translatorische Modifikation eines Proteins handelt, erbrachte folgendes Experiment: Zellen wurden gleichzeitig mit CAP und CHX vergiftet, d.h. die gesamte Proteinbiosynthese wurde unterbunden. Danach wurde $^{35}\text{SO}_4^{--}$ zugegeben, nach einer Stunde "gechased" und die Zellen wie üblich aufgearbeitet. In diesem Fall ließ sich wiederum aus dem Dichtebereich von 22 % Urographin ein radioaktives Protein, das

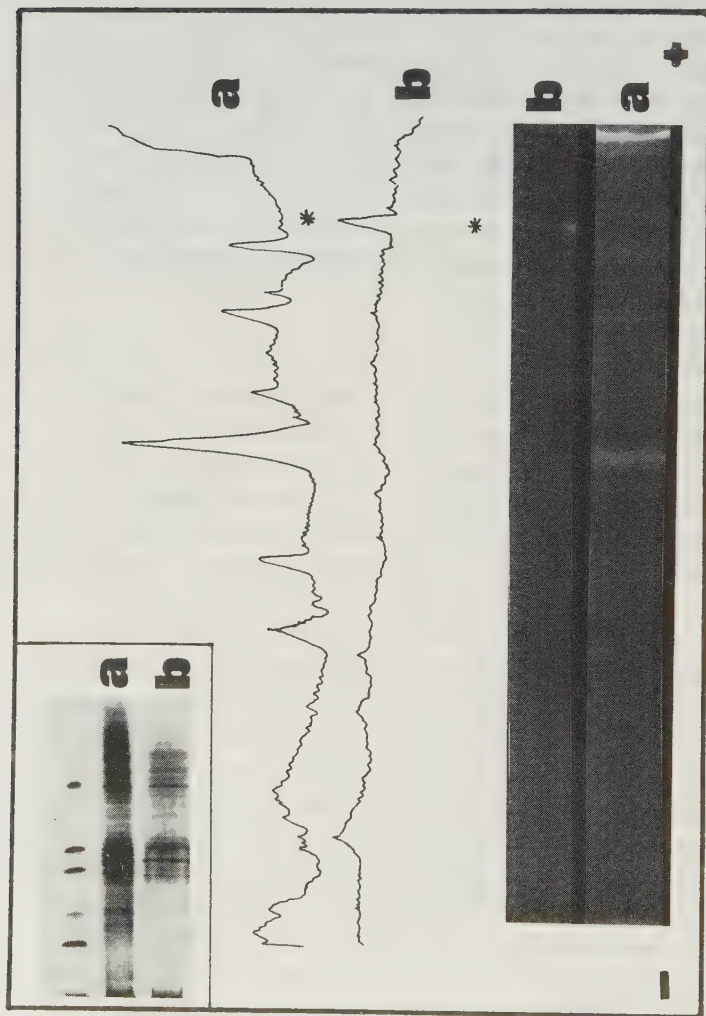


Abb. 28: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von gesamt-mitochondrialem Protein (a) sowie von Plasmamembranen (b). Aus Zellen, die in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{S}_{304}$ markiert worden waren, wurden Mitochondrien und Plasmamembranen gewonnen und in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Insert: Coomassieblau-Anfärbung des fertigen Gels (verkleinert) (oberste Spur = unten: Autoradiogramm, darüber die dazugehörigen Densitogramme) (Eichproteine)

im SDS-Polyacrylamidgel bei 17 kd bandiert, nachweisen. Die eben beschriebenen Versuche lassen es als sicher erscheinen, daß das fragliche Protein post-translatorisch, also Ribosomen-unabhängig, mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierbar ist. Interessant sind in diesem Zusammenhang neue, noch unveröffentlichte Befunde von Van't Sant et al. (1980), die für Neurospora crassa ein ähnliches Phänomen beschreiben:

Die Autoren fanden bei ihren Untersuchungen ein Protein von 18 kd, das in Gegenwart von CHX mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$, nicht aber mit ^3H - bzw. ^{14}C -Aminosäuren markierbar ist und das sich darüberhinaus als partiell Säure-labil und empfindlich gegen Desulfatisierung erwies. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem von Van't Sant et al. (1980) beschriebenen 18 kd-Produkt in Neurospora crassa um ein analoges Protein zu dem oben geschilderten 17 kd-Protein aus Saccharomyces cerevisiae handelt.

Faßt man die unter 3.1. und 3.2. beschriebenen Resultate zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: Innerhalb der zur Verfügung stehenden Nachweisgrenzen ließ sich bei Wildtyphefen weder im Zellkern noch in der Zellmembran ein mitochondriales Translationsprodukt nachweisen. Die geschilderten Versuche machen demnach Modelle, die mitochondrial synthetisierten Proteinen außerhalb der Mitochondrien eine regulatorische Rolle zusprechen (z.B. Puglisi & Algeri, 1970; Barath & Küntzel, 1972 a + b; Rouslin, 1976), unwahrscheinlich. Sie schließen allerdings nicht aus, daß niedermolekulare Substanzen wie Nucleotide als Signale aus den Mitochondrien ausgeschleußt werden.

D) Diskussion und Ausblick

Ausgangspunkt der Arbeit war die Überlegung, daß eine Koordination der Syntheseleistungen des nucleocytoplasmatischen und des mitochondrialen Systems eine notwendige biologische Voraussetzung bei Änderungen der mitochondrialen Genexpression sein muß. Eine solche Situation ist für die Hefe als fakultativem Anaerobier beispielsweise dann gegeben, wenn sie von vergärbarem auf nicht-vergärbares Substrat (Derepression) bzw. umgekehrt (Repression) transferiert wird. Biochemisch erfassbare Unterschiede zwischen beiden Zuständen sind demzufolge die Ursache oder aber (meist) die Folge regulatorischer Prozesse. So ist schon seit einiger Zeit bekannt, daß in dereprimierten Zellen die Atmungsaktivität und der Cytochromgehalt (Perlman & Mahler, 1974), die mitochondriale RNS- sowie Proteinbiosynthese (South & Mahler, 1968; Ibrahim et al., 1973) gegenüber reprimierten Zellen erhöht ist.

Eine der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war die nach dem Modus der Zuleitung der Information über veränderte Stoffwechselsituationen an die Mitochondrien. Mit dem Seitenblick auf bakterielle Systeme und vor dem Hintergrund, daß in Hefe (ähnlich wie in Bakterien) die Konzentration an cAMP von der Konzentration an vergärbarem Substrat abhängt, wurde untersucht, ob es in Hefemitochondrien ein cAMP-erkennendes System gibt. Mit dem Nachweis der Existenz eines solchen ist der Spekulation, daß cAMP im untersuchten System Signalcharakter zukommt, eine solide Basis geschaffen worden, wenngleich sie per se keine Hinweise auf den Stellenwert liefert. Der Nachweis, daß cAMP die mitochondriale Transcription in reprimierten Zellen spezifisch stimuliert, läßt allerdings vermuten, daß cAMP auch in vivo bei der mitochondrialen Transcriptionskontrolle eine entscheidende Rolle zukommt. Einige der experimentellen Befunde ließen sich dahingehend interpretieren, daß die mitochondriale RNS-Polymerase selbst das cAMP-Rezeptorprotein darstellt (die Identität der beiden Proteine konnte bislang nicht geprüft werden). So handelt es sich bei beiden Proteinen um lösliche cytoplasmatische Translationsprodukte mit einem Molekulargewicht von 45 kd (Scragg, 1976; Levens et al., 1980), die in geringen Mengen ("minor proteins") in Mitochondrien vor-

liegen. Beide Proteine besitzen eine Affinität zu DNS und sind in ihrer Konzentration von der Konzentration an vergärbarem Substrat abhängig (die RNS-Polymerase unterliegt der Glucoserepression (South & Mahler, 1968; Lustig et al., 1980), und zwar auf prä-translationaler Ebene bezüglich ihres um 2 kd größeren Precursorproteins (Levens et al., 1980)). cAMP könnte über eine Interaktion mit der RNS-Polymerase deren Aktivität erhöhen und/oder deren Bindung an das Substrat = mit DNS erhöhen. Alternativ ist aber auch daran zu denken, daß die Stimulation der mitochondrialen Transcription aus einer cAMP-vermittelten Erhöhung verfügbarer RNS-Polymerase-Moleküle resultiert, was z.B. durch cAMP-stimulierte Neusynthese, cAMP-vermittelten Transport durch die Membran oder cAMP-abhängiges Processing des Precursorproteins bewirkt werden könnte. In diesem Fall wäre das cAMP-Rezeptorprotein mit der RNS-Polymerase nicht identisch. Der zeitliche Verlauf der Transcriptionsstimulation erlaubt es nicht, eine der Möglichkeiten zu favorisieren, da sich nicht abschätzen läßt, wie schnell extern zugesetztes cAMP intramitochondrial verfügbar wird. Auch der experimentelle Befund, daß die Stimulation der mitochondrialen Transcription sequenzspezifisch ist, läßt beide Möglichkeiten offen, da weder über Promoterstärken noch über eventuelle Cofaktoren irgendwelche Informationen vorliegen. (Ein Kandidat für einen Cofaktor ist jenes mitochondriale Translationsprodukt, das in Gegenwart von cAMP an DNS-Cellulose gebunden wird, aber nicht mit 8-Azido-cAMP markierbar ist. Die Tatsache, daß die cAMP-stimulierte Bindung mitochondrialer Translationsprodukte nicht die gleiche DNS-Selektivität zeigt wie die Bindung von cAMP/Protein-Komplexen ließe sich durch eine Sequenz-spezifische (Promoter ?) Funktion des erwähnten Polypeptids erklären).

Von großem Interesse ist es in der nahen Zukunft, einen Beweis für die Identität/Nicht-Identität der beiden Proteine zu erbringen. Dabei ist in erster Linie an den Einsatz spezifischer Antikörper gegen mitochondriale RNS-Polymerase zu denken, wie sie jüngst von Levens et al. (1980) beschrieben wurden. Des weiteren brächte eine Untersuchung der cAMP-Stimulierbarkeit

der RNS-Synthese bei isolierten Mitochondrien in vitro Klarheit darüber, ob der Stimulation der mitochondrialen RNS-Synthese extra-mitochondriale Prozesse vorausgehen (z.B. Neusynthese der RNS-Polymerase) oder ob die vorhandene RNS-Polymerase ausreicht, den gleichen Effekt wie bei den in vivo-Versuchen zu bewirken.

Unabhängig davon, ob die RNS-Polymerase das cAMP-Rezeptorprotein ist oder nicht, sprechen etliche Kriterien wie z.B. die selektive Affinität zu bestimmten Regionen der mitDNS dafür, daß dem charakterisierten cAMP-bindenden Protein bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression eine Bedeutung beizumessen ist. Mit ihrem hoch-affinen cAMP-Rezeptor sind Mitochondrien in der Lage, rasch auf Änderungen der C-Quelle zu reagieren. Für den Fall, daß cAMP-bindendes Protein und RNS-Polymerase nicht identisch sind, erhebt sich die Frage, welche anderen mitochondrialen Komponenten als Kandidaten für regulatorische Aufgaben in Betracht zu ziehen sind. Einige Autoren (Beattie, 1971; Sanders et al., 1973) vertreten die Meinung, daß dem Hämbiosynthesepathway eine zentrale Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression beizumessen sei. Bei diesem Syntheseweg sind einige (nämlich die ersten und die letzten) der Enzymaktivitäten in den Mitochondrien lokalisiert (Sanders et al., 1973), ferner ist bekannt, daß mindestens drei Enzyme, nämlich die ALA-Dehydratase (Mahler & Lin, 1974), die ALA-Synthetase (Jayaraman et al., 1971) und die Protoporphyrinogen IX oxidase (Poulson & Polglase, 1974) der Glucoserepression unterliegen. Theoretisch ließen sich mitochondriale Funktionen allein über die Hämbiosynthese steuern, denn Biogenese und Assembly einer funktionalen Atmungskette sind von der Verfügbarkeit von Porphyrinen abhängig (vgl. Saltzgeber-Müller & Schatz, 1978). (Ob Häm oder einem Hämprecursor darüberhinaus die Rolle eines positiven oder negativen Effektmoleküls zukommt, ist nicht bekannt, obgleich es bei der Regulation der Catalasesynthese (Catalase ist ein Kern-codiertes Protein) dafür Anhaltspunkte gibt (Ammerer et al., 1980)). Dem cAMP-bindenden Protein käme also auch als möglichem Bestandteil des Hämbiosynthesewegs eine zentrale Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression zu. (Die Beeinflussung der Hämbiosynthese durch cAMP ist Gegenstand laufender

Arbeiten (Meier, persönliche Mitteilung)). Mit dieser Annahme ist allerdings die Beobachtung schwer in Einklang zu bringen, daß das cAMP-bindende Protein teilweise mit mitDNS assoziiert vorliegt. Nach den bislang publizierten Daten gibt es keinerlei Anhaltspunkt für die Codierung einer an der Hämbiosynthese beteiligten Komponente auf der mitDNS, auch die intra-mitochondrialen Enzyme des Hämbiosynthesewegs sind kerncodiert. Andererseits könnte eine von den Mitochondrien regulierte Hämkonzentration im nucleo-cytoplasmatischen Partnersystem Signalwirkung besitzen. Einige der oben zitierten Arbeiten, die im Postulat eines mitochondrial synthetisierten Repressors im Kern gipfelten, ließen sich möglicherweise auch durch veränderte Häm- bzw. Hämprecursor-Konzentrationen im Cytoplasma erklären. (Der Export mitochondrialer Translationsprodukte in den Zellkern und in die Zellmembran konnte ja im Rahmen der Arbeit weitgehend ausgeschlossen werden.)

Das genetische System der Mitochondrien besitzt also - wenn überhaupt - nur einen indirekten Einfluß auf das nucleo-cytoplasmatische System in Form von niedermolekularen Molekülen. Die Genexpression der meisten mitochondrialen Proteine (das sind die auf der nucDNS codierten) steht unter der Kontrolle des nucleo-cytoplasmatischen Systems. Aber auch hinsichtlich der mitochondrialen Genexpression ist dem nucleären System eine dominierende Rolle beizumessen: Sowohl die mitochondriale RNS-Polymerase (Scragg, 1976) als auch das (identische ?) cAMP-Rezeptorprotein wird an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet.

Die Vorstellung jedoch, daß die gesamte Regulation der mitochondrialen Genexpression über die RNS-Polymerase laufen könnte (möglicherweise feinreguliert über verschiedene Promoterstärken und post-transcriptionale Prozesse wie Maturierung von Protein- und RNS-Precursoren oder RNase/Protease-Aktivitäten), ist aller Voraussicht nach ebenfalls zu simpel, wie die folgenden Arbeiten zeigen:

a) Poyton & Kavanagh (1976) fanden, daß in vitro der Zusatz cytoplasmatischer Überstände zu Mitochondrien die Synthese aller mitochondrialen Translationsprodukte stimuliert. Werden diese Überstände mit einem Antiserum gegen Holo-Cytochromoxidase titriert, so wird die Synthese der drei mitochondrial gebildeten Untereinheiten I, II und III im Gegensatz zu allen anderen Translationsprodukten nicht länger stimuliert. Eine

passive Regulation, d.h. Abbau der neu synthetisierten Untereinheiten infolge der Nicht-Assemblierung, mag zwar eine Rolle spielen, sicherlich aber keine so ausgeprägte, daß sie für die obige Beobachtung allein verantwortlich gemacht werden kann. (Auf Grund von Hemmstoffversuchen ist bekannt, daß die mitochondrial synthetisierten Subunits der Cytochromoxidase über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde akkumuliert werden können (Lin et al., 1974)). Poyton und Kavanagh schlossen aus ihren Experimenten, daß es mindestens zwei verschiedene Regulationsprinzipien bei der mitochondrialen Genexpression geben müsse. Um mit der obigen Vorstellung, daß die RNS-Polymerase das alleinige regulative Prinzip der mitochondrialen Genexpression sein könnte, in Einklang zu stehen, muß man annehmen, daß entweder einer oder mehreren der cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase eine Funktion bei der Promotererkennung der mitochondrialen RNS-Polymerase zukommt oder aber, daß diese Proteine normalerweise RNase- bzw. Protease-Aktivitäten bezüglich ihrer mitochondrialen Partnerproteine verhindern oder daß sie beim "splicen" der Precursor-RNS der mitochondrial codierten Cytochromoxidase-Untereinheiten eine entscheidende Rolle spielen. (Gegen den letzten Punkt spricht, daß oxi 1 und oxi 2, die Gene für su II bzw. III, im Gegensatz zu oxi 3 (das für su I codiert), keine Mosaikgene sind (Fox, 1980; Thalenfeld & Tzagoloff, 1980)).

b) Sowohl für den Cytochromoxidase- wie für den ATPase-Komplex wurden Kernmutanten gefunden (Ebner et al., 1973; Tzagoloff et al., 1975), die spezifische Ausfälle jeweils einer mitochondrial synthetisierten Komponente zeigen. Auch in diesen Fällen gibt es mehrere Interpretationsmöglichkeiten, die aber alle dagegen sprechen, einzig die RNS-Polymerase für die Regulation der mitochondrialen Genexpression verantwortlich zu machen: Einmal könnte von der Kernmutation eine cytoplasmatisch gebildete su des jeweiligen Enzymkomplexes betroffen sein. In diesem Fall sollte das Produkt zusätzlich zu seiner bekannten eine der unter a) aufgeführten Funktionen besitzen. Ist das von der Mutation betroffene Genprodukt keine Untereinheit des jeweiligen Enzymkomplexes, so muß es sich um ein Protein handeln, das zusätzlich zur RNS-Polymerase in die mitochondriale Genexpression eingreift und spezifisch für die Expression nur eines Polypeptids wäre. (Ein Ausfall der RNS-Polymerase würde alle mito-

chondrialen Genprodukte gleichermaßen treffen.)

Die geschilderten Ergebnisse zeigen, daß cytoplasmatisch synthetisierte Proteine einen entscheidenden Einfluß auf die Expression und/oder Membranintegration mitochondrialer Translationsprodukte besitzen.

Weitaus schwieriger gestaltet sich die Beantwortung der Frage, inwieweit mitochondriale Produkte selbst bei der mitochondrialen Genexpression eingreifen. Arbeiten der letzten Monate deuten die Beteiligung eines mitochondrial codierten Proteins beim "splicing" von Precursor-RNS aus der cob-Region sowie möglicherweise der oxi 3-Region an (Jacq et al., 1980). Ob darüber hinaus mitochondriale Translationsprodukte als Repressoren und/oder positive Effektoren in die mitochondriale Genexpression eingreifen (wie dies in verschiedenen Arbeiten gefordert wird, z.B. Rouslin, 1976), ist nicht geklärt. In älteren Arbeiten (Rödel, 1977 a + b), die sich mit DNS-bindenden mitochondrialen Translationsprodukten auseinandersetzen, wird im wesentlichen ein Protein mit etwa 24 kd beschrieben, das unter den Versuchsbedingungen an mitDNS gebunden vorliegt. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente zeigen nun, daß es sich bei diesem Protein aller Voraussicht nach um su III der Cytochromoxidase handelt, also um ein Protein, das normalerweise in der inneren Mitochondrienmembran gefunden wird und das möglicherweise die Bindungsstelle für Cytochrom c im Cytochromoxidase-Komplex darstellt (Dockter et al., 1978). Es erhebt sich nun natürlich die Frage, ob dieser DNS-Bindung eine biologische Bedeutung beizumessen ist oder ob sie ein versuchsbedingtes Artefakt darstellt. Die einfachste Vorstellung ist die, daß bei der Lyse der Mitochondrien ein Teil der inneren Mitochondrienmembran in Assoziation mit der mitDNS bleibt. Voraussetzung dafür wäre, daß die mitDNS bei Hefe membrangebunden vorliegt, was bislang nicht bewiesen ist, was aber für mitDNS aus HeLa-Zellen beschrieben wurde (Albring et al., 1977). Gegen diese Vorstellung einer artifiziellen Bindung sprechen allerdings verschiedene Punkte:

- 1) Su III der Cytochromoxidase wurde an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, in einem potentiellen Cytochromoxidase/DNS-Komplex müßten sich also auch die anderen beiden mitochondrial synthetisierten Subunits (die z.T. weiter

innen in der Membran liegen, Dockter et al., 1978) nachweisen lassen.

2) Nur su III zeigt bei DNS-Cellulose-Chromatographie Affinität zu DNS, unter Bedingungen also, wo solubilisierte Mitochondrien, z.T. nach DNase-Verdauung auf die Säule aufgetragen werden. Für die beobachtete DNS-Bindung müssen also andere Aspekte in Erwägung gezogen werden. An dieser Stelle sei noch einmal daran erinnert, daß unter den Bedingungen der Glucoserepression sowie der Anaerobiosis die Quantität DNS-bindender mitochondrialer Translationsprodukte gegenüber dereprimierten Bedingungen erhöht ist. In beiden Fällen handelt es sich um Situationen, in denen mitochondriale Funktionen für die Zelle nicht oder nur sehr eingeschränkt benötigt werden, die mitochondriale Genexpression also reduziert wird. Unter diesen Bedingungen werden die cytoplasmatisch translatierten su IV bis VII der Cytochromoxidase vermindert gebildet (Lustig et al., 1980), während ihre mitochondrial synthetisierten Partnerproteine vermutlich zunächst unvermindert weitergebildet werden, ohne assembliert zu werden. (Diese Situation erinnert an jene, in der die cytoplasmatische Proteinbiosynthese durch CHX ausgeschaltet wird.) Möglicherweise werden nicht die maturen Proteine, sondern Precursor-Proteine akkumuliert, denn Arbeiten jüngerer Datums deuten an, daß das Prozessieren von Vorläuferproteinen häufig mit der Membranassemblierung und/oder dem Transport durch Membranen gekoppelt ist (Schatz, 1980; Hennig et al., 1980). Denkbar wäre nun, daß in dieser Situation nicht assemblierte su III der Cytochromoxidase oder ihr geringfügig größerer Precursor (für den es allerdings keine Evidenzen gibt, Thalenfeld & Tzagoloff, 1980) an mitDNS bindet und dort eventuell die Funktion eines Repressors erfüllt, der die Transcription z.B. der mitochondrial codierten Cytochromoxidase-Untereinheiten unterbindet. Diese einfache feed-back-Regulation auf Transcriptionsebene wäre für die Zelle extrem ökonomisch. Wenn sich nämlich durch Änderung der C-Quelle mitochondriale Funktionen als wichtig erweisen, mitochondriale Genexpression also vonnöten ist, könnten sofort nach Bereitstellung der cytoplasmatisch gebildeten Cytochromoxidase-Untereinheiten su III wieder assembliert werden, die Transcription der reprimierten Gene wieder einsetzen. Obgleich sehr hypothetisch, so gibt es doch einige in der Literatur beschriebene Phänomene, die sich mit diesem

Modell leicht erklären ließen:

- 1) Sequenzierdaten von Thalenfeld und Tzagoloff (1980) zeigen, daß 6 der 15 Amino-terminalen Aminosäuren von su III der Cytochromoxidase basisch sind. Die Funktion dieser einzigartigen Häufung basischer Aminosäuren in einem ansonsten extrem hydrophoben Protein ist bislang unbekannt, fände aber durch das obige Modell eine einfache Erklärung, denn basische Aminosäuren sind ja geradezu prädestiniert, mit den negativen Ladungen einer DNS in Wechselwirkung zu treten.
- 2) Cytochromoxidase scheint in ihrer Regulation verglichen mit den anderen Enzymkomplexen der Atmungskette eine Sonderstellung einzunehmen (Lin et al., 1974). Als einziges Enzym zeigt sie eine Akkumulation der mitochondrial gebildeten Untereinheiten, wenn wachsende Zellen mit CHX vergiftet werden (Lin et al., 1974). Damit ist eine wichtige Voraussetzung für das obige Modell gegeben.
- 3) Bei Markierungskinetiken an dereprimierenden Zellen läßt sich eine bestimmte Ordnung hinsichtlich des Auftauchens der Markierung in immunpräzipitierbaren su I, II und III der Cytochromoxidase feststellen. Schwab et al. (1972) konnten bei Neurospora crassa zeigen, daß dafür vermutlich unterschiedliche Pool-Größen der einzelnen Untereinheiten verantwortlich sind. Die bei Hefe beobachtete Reihenfolge des Auftauchens markierter, immunpräzipitierbarer Cytochromoxidase-Untereinheiten (su II $\rightarrow$ su I $\rightarrow$ su III; Chandrasekaran et al., 1980) hätte nach dem obigen Modell seine Ursache darin, daß su III wegen ihrer Bindung an DNS von allen Untereinheiten am besten gegen Proteaseverdauung geschützt wäre, damit zu Beginn der Derepressionsphase in der relativ höchsten Konzentration vorläge und so am effektivsten mit markiertem Material bei der Immunfällung kompetieren würde.
- 4) Die bereits geschilderten Versuche von Poyton und Kavanagh (1976), denen zufolge ein mit Anti-Holocytochromoxidase titrierter cytoplasmatischer Überstand die Synthese von su I, II und III der Cytochromoxidase im Gegensatz zu allen anderen mitochondrialen Translationsprodukten nicht mehr stimuliert, fänden durch das obige Modell ebenfalls eine einfache Erklärung: Durch das Ausfällen der su IV bis VII fehlen den su I bis III die zur Assemblierung nötigen Partner, so daß a) su III ihre Funktion als Repressor erfüllen könnte und b) die von

den Autoren geforderten zwei verschiedenen cytoplasmatischen Regulationsproteine nicht mehr nötig sind. Diese Interpretation setzt eine selektive, auf die Gene für su I, II und III beschränkte Repressoraktivität voraus.

5) Saltzgaber-Müller & Schatz (1978) beschreiben eine Häm-defiziente Mutante, bei der ohne Supplementierung von Häm oder eines Häm-Precursors nur noch 3 der 7 Cytochromoxidase-Untereinheiten, nämlich II, III und VI nachweisbar sind. Auch dieses Resultat steht im Einklang mit dem Modell, denn su III als möglicher Repressor läßt sich wiederum in einer Situation nachweisen, in der eine Reduktion der mitochondrialen Genexpression biologisch sinnvoll erscheint. (Häm ist notwendiger Bestandteil einer funktionsfähigen Atmungskette und Voraussetzung für deren Assemblierung!)

Damit möchte ich die Auflistung von Daten abschließen, die mit dem Modell eine (einfache) Erklärung fänden. In Abb. 29 ist das Modell graphisch dargestellt.

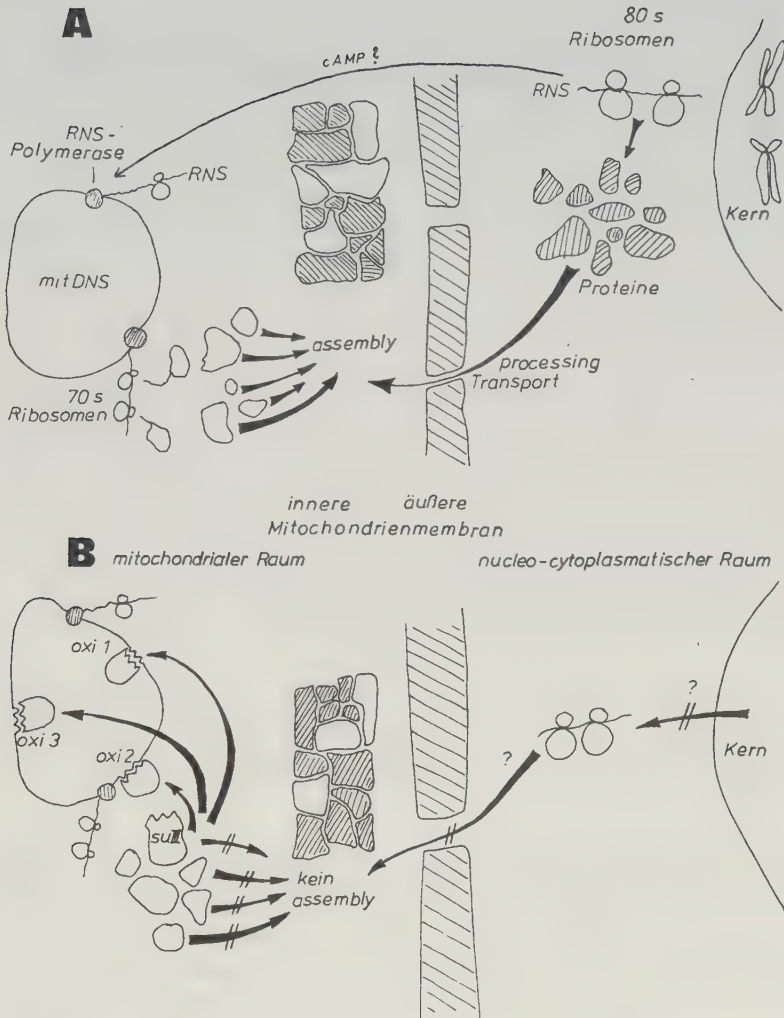


Abb. 29: Modell zur Bedeutung von su III der Cytochromoxidase bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression
A: dereprimierte Situation: beide an der Mitochondriogenese beteiligten genetischen Systeme bilden Proteine der inneren Mitochondrienmembran; diese werden assembliert.
B: reprimierte Situation: Synthese und/oder Import der cytoplasmatisch gebildeten Proteine wird zumindest teilweise reduziert, während die mitochondrial synthetisierten Untereinheiten zunächst weitergebildet werden. Infolge der Nicht-Assemblierung kann su III ihre Repressorfunktion an der mitDNS wahrnehmen.

E) Zusammenfassung

- 1) Mitochondrien der Hefe Saccharomyces cerevisiae besitzen ein lösliches cAMP-bindendes Protein, das sich in seiner Konzentration sowie seiner Bindungskonstante von dem im Cytoplasma vorkommenden unterscheidet (vgl. 1.2.8.). Eine eingehende Charakterisierung ergab, daß es sich um ein bezüglich cAMP hoch-affines Protein handelt ($K_D = 10^{-9}$ M), das in sehr geringer Konzentration vorliegt (etwa 100 bis 200 Moleküle pro mitDNS oder etwa 5000 bis 10000 Moleküle pro Zelle) und teilweise mit mitDNS assoziiert vorliegt. Seine Bindung an mitDNS wird durch cAMP erhöht, ist von der Sequenz der eingesetzten DNS abhängig (also nicht statistisch) und spielt vermutlich auch in vivo eine Rolle. Das Molekulargewicht des an cytoplasmatischen Ribosomen gebildeten Proteins beträgt 45 kd. Die pH-abhängige cAMP-Bindung wird durch Mg^{++} -Ionen in Form einer Optimumskurve stimuliert. Dereprimierte, atmende Zellen besitzen mehr cAMP-bindende Proteine als reprimierte. Die mögliche Rolle des Proteins bei der Regulation der mitochondrialen Genexpression wird diskutiert.
- 2) cAMP stimuliert die mitochondriale RNS-Synthese. Detaillierte Untersuchungen zeigen, daß die Stimulation der Transcription verschiedener Bereiche der mitDNS unterschiedlich stark, d.h. sequenzspezifisch ist.
- 3) DNS-bindende mitochondriale Translationsprodukte wurden näher untersucht. Die hauptsächlich bindende Komponente scheint Unter-einheit III der Cytochromoxidase zu sein, daneben gibt es aber weitere, durch cAMP stimulierbare Bindungen eines (oder mehrerer) mitochondrialen(r) Translationsprodukte(s) (vorzugsweise eines von M_r 42 kd). Die mögliche Bedeutung dieser Bindung, die Stoffwechsel-abhängig und sequenzspezifisch ist, wird diskutiert.
- 4) Weder im Zellkern noch in der Zellmembran lassen sich mitochondriale Translationsprodukte nachweisen. Der Befund wird in Zusammenhang mit den gängigen Hypothesen der Koordination von mitochondrialer und cytoplasmatischer Genexpression diskutiert. Ein in Gegenwart von CHX mit $^{35}SO_4^{--}$ markierbares Protein ($M_r = 17$ kd), das in der Plasmamembran-fraktion gefunden wird, ist

vermutlich kein mitochondriales Translationsprodukt, sondern vielmehr eine Ribosomen-unabhängige post-translationale (und damit weder durch CAP noch durch CHX hemmbare) Modifikation eines cytoplasmatischen Proteins.

F) Verzeichnis der verwendeten Literatur

Alberts, B. and Herrick, G. (1970)

"DNA-Cellulose Chromatography"

Meth. Enzymol. 21, 198 - 217

Albring, M., Griffith, J. and Attardi, G. (1977)

"Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1348 - 1352

Ammerer, G., Richter, K., Hartter, E., Hörtnner, H. and

Ruis, H. (1980)

"Regulation of catalase biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*"

In: 10th International Conference of Yeast Genetics and Molecular Biology", Abstracts p. 62

Ashwell, M. and Work, T.S. (1970)

"The Biogenesis of Mitochondria"

Ann. Rev. Biochem. 39, 251 - 290

Bach, M.-L., Lacroute, F. and Botstein, D. (1979)

"Evidence for Transcriptional Regulation of Orotidine-5'-phosphate decarboxylase in Yeast by Hybridization of mRNA to the Yeast Structural Gene Cloned in *Escherichia coli*"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 386 - 390

Bandlow, W., Metzke, R., Klein, A., Kotzias, K., Doxiadis, I.,

Bechmann, H., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1977)

"Macromolecular synthesis and energy level in a mitochondrial conditional yeast mutant, tsm-8"

Europ. J. Biochem. 76, 373 - 382

Barath, Z. and Küntzel, H. (1972, a)

"Induction of Mitochondrial RNA Polymerase in *Neurospora crassa*"

Nature New Biol. 240, 195 - 197

- Barath, Z. and Küntzel, H. (1972, b)
"Cooperation of Mitochondrial and Nuclear Genes Specifying the Mitochondrial Genetic Apparatus in *Neurospora crassa*"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1371 - 1374
- Beattie, D.S. (1971)
"The possible relationship between heme synthesis and mitochondrial biogenesis"
Arch. Biochem. Biophys. 147, 136 - 142
- Beauchamp, P.M. and Gross, S.R. (1976)
"Increased mitochondrial leucyl - and phenylalanyl - tRNA synthetase as a result of inhibition of mitochondrial protein synthesis"
Nature 261, 338 - 340
- Beckwith, J.R. and Zipser, D. (eds.) (1970)
"The Lactose Operon"
Cold Spring Harbor Laboratory
- Bhargava, M.M. and Halvorson, H.O. (1971)
"Isolation of Nuclei from Yeast"
J. Cell Biol. 49, 423 - 429
- Bleeg, H.S., Bak, A.L., Christiansen, C., Smith, K.E. and Stenerup, A. (1972)
"Mitochondrial DNA and Glucose Repression in Yeast"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 527 - 530
- Böhni, P.C., Gasser, S., Leaver, C.J. and Schatz, G. (1980)
"A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmically-made precursors to mitochondrial proteins"
In: "10th International Conference of Yeast genetics and molecular biology", Abstract p. 139

Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974)

"A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels"

Europ. J. Biochem. 46, 83 - 88

Borst, P., Bos, J.L., Grivell, L.A., Groot, G.S.P., Heyting, C., Moorman, A.F.M., Sanders, J.P.M., Talen, J.L., Van Kreijl, C.F. and Van Ommen, G.J.B. (1977)

"The physical map of yeast mitochondrial DNA anno 1977"

In: "Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria"

(Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds)

De Gruyter, Berlin pp. 213 - 254

Borst, P. and Grivell, L.A. (1971)

"Mitochondrial Ribosomes"

FEBS Lett, 13, 73 - 88

Borst, P. and Grivell, L.A. (1978)

"The mitochondrial genome of yeast"

Cell 15, 705 - 723

Bourgeois, S. and Pfahl, M. (1976)

"Repressors"

In: "Advances in Protein Chemistry, Vol. 30"

(Anfinsen, C.B., Edstall, J.T. and Richards, F.M., eds)

pp. 1 - 99

Bradford, M.M. (1976)

"A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding"

Anal. Biochem. 72, 248 - 254

Burger, G., Lang, B., Bandlow, W. and Kaudewitz, F. (1975)

"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁-segment of the respiratory chain in yeast. II. The binding of antimycin to mitochondrial particles and the function of two different binding sites."

Biochim. Biophys. Acta 396, 127 - 201

Cabral, F., Saltzgaber, J., Birchmeier, W., Deters, D.,
Frey, T., Kohler, C. and Schatz, G. (1976)

"Structure and Biosynthesis of Cytochrom c Oxidase"

In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria

(Th. Bücher et al., eds) pp. 215 - 230

Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam

Cabral, F., Solioz, M., Rudin, Y., Schatz, G., Clavilier, L.
and Slonimski, P.P. (1978)

"Identification of the structurale gene for yeast
cytochrom c oxidase subunit II on mitochondrial DNS"

J. Biol. Chem. 253, 297 - 304

Chambers, D.A. and Zubay, G. (1969)

"The stimulatory effect of cyclic adenosine 3'5'- mono-
phosphate on DNA-directed synthesis of β -galactosidase
in a cell-free system"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 118 - 122

Chandrasekaran, K., Dharmalingam, K. and Jayaraman, J.
(1980)

"Assembly of mitochondria in yeast. Complementation of
mitochondrial and cytosolic products in a temporal
sequence in vitro"

Europ. J. Biochem. 103, 471 - 480

Chandrasekaran, K. and Jayaraman, J. (1978)

"Effect of cyclic AMP on the biogenesis of cytochrome
oxidase in yeast"

FEBS Lett. 87, 52 - 54

de Crombrughe, B., Chen, B., Anderson, W., Nissley, P.
Gottesman, M. and Pastan, I. (1971)

"lacDNA, RNAPolymerase and cyclic AMP receptor protein,
cyclic AMP, lac repressor and inducer are the essential
elements for controlled lac transcription"

Nature New. Biol. 231, 139 - 142

Claisse, M.L., Spyridakis, A. and Slonimski, P.P. (1977)
"Mutations at any one of the three unlinked mitochondrial
genetic loci BOX 1, BOX 4 and BOX 6 modify the structure
of cytochrome b polypeptide(s).

In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria

(Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.,
eds.)

Berlin: De Gruyter pp. 337 - 344

Clark-Walker, G.D. and Linnane, A.W. (1966)

"In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 8 - 13

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and
Laemmli, U.K. (1977)

"Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl
Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis"

J. Biol. Chem. 252, 1102 - 1106

Crick, F. (1979)

"Split genes and RNA splicing"

Science 204, 264 - 271

Cryer, D.R., Eccleshall, R. and Marmur, J. (1975)

"Isolation of Yeast DNA"

In: "Methods in Cell Biology, Vol. XII"

(Prescott, D.M., ed) pp. 39 - 44

Academic Press, New York

Datta, A., De Haro, C. and Ochoa, S. (1978)

"Translational control by hemin is due to binding to
cyclic AMP - dependent protein kinase"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1148 - 1152

Dockter, M.E., Steinemann, A. and Schatz, G. (1978)

"Mapping of Yeast Cytochrome c Oxidase by Fluorescence
Resonance Energy Transfer"

J. Biol. Chem. 253, 311 - 317

Douglas, M. and Butow, R.A. (1976)

"Variant forms of mitochondrial translation products in yeast: evidence for location of determinants on mitochondrial DNA"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1083 - 1086

Duffus, J.H. (1975)

"The Isolation of Yeast Nuclei and Methods to Study Their Properties"

In: Methods in Cell Biology, Vol. XII (Prescott, D.M., ed)
pp. 77 - 97

Ebner, e., Mason, T.L. and Schatz, G. (1973)

"Mitochondrial Assembly in Respiration-deficient Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*"

J. Biol. Chem. 248, 5369 - 5378

Eccleshall, T.R., Needleman, R.B., Storm, E.M.,

Buchferer, B. and Marmur, J. (1978)

"A temperature-sensitive yeast mitochondrial mutant with altered cytochrome c oxidase subunit I"

Nature 273, 67 - 70

Emmer, M., De Crombrugghe, B., Pastan, I. and Perlman, R. (1970)

"Cyclic AMP receptor protein of *E.coli*: its role in the synthesis of inducible enzymes"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 480 - 487

Evans, I.H., Egilsson, V. and Wilkie, D. (1976)

"Mitochondrial Involvement in the control of cell function in *Saccharomyces cerevisiae*"

In: "Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria" (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds.) pp. 125 - 136

Fang, M. and Butow, R.A. (1970)

"Nucleotide reversal of mitochondrial repression in *Saccharomyces cerevisiae*"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1579 - 1583

Fedorcsák, I., Natarajan, A.T. and Ehrenberg, L. (1969)

"On the extraction of ribonucleic acid with template activity from barley embryos using diethyl pyrocarbonate as nuclease inhibitor"

Europ. J. Biochem. 10, 450 - 458

Fonty, G., Goursoot, R., Wilkie, D. and Bernardi, G.

(1978)

"The Mitochondrial Genome of Wild - type Yeast Cells"

J. Mol. Biol. 119, 213 - 235

Fox, T.D. (1979)

"Genetic and physical analysis of mitochondrial gene for subunit II of yeast cytochrom c oxidase"

J. Mol. Biol. 130, 63 - 82

Gill, G.N., Holdy, K.E., Walton, G.M. and Kanstein, C.B.

(1976)

"Purification and characterization of 3':5' - cyclic GMP - dependent protein kinase"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3918 - 3922

Gillespie, D. and Spiegelman, S. (1965)

"A Quantitative Assay for DNA - RNA Hybrids with DNA immobilized on a Membrane"

J. Mol. Biol. 12, 829 - 842

Gilman, A.G. and Murad, F. (1974)

"Assay of cyclic nucleotides by receptor protein binding displacement"

In: Meth. Enzymol. Vol. 38 (Hardman, J.G. and O'Malley, B.W., eds.) pp. 49 - 57

Grivell, L.A., Arnberg, A.C., Boer, P.H., Borst, P.,
Van Bruggen, E.F.J., Hensgens, L.A.M., Osinga, K.A.
and Tabak, H.F. (1980)

"Split genes on yeast mitochondrial DNA: organisation
and expression"

In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"

(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)

Elsevier/North-Holland, im Druck

Groot, G.S.P., Mason, T.L. and van Harten-Loosbroek, N.
(1979)

"Var I is Associated with the Small Ribosomal Subunit of
Mitochondrial Ribosomes in Yeast"

Molec. Gen. Genet. 174, 339 - 342

Gross, M. (1979)

"Regulation of protein synthesis by hemin"

J. Biol. Chem. 254, 2378 - 2383

Haid, A., Schweyen, R.J., Bechmann, H., Kaudewitz, F.,
Solioz, M. and Schatz, G. (1979)

"The mitochondrial COB region in yeast codes for
apocytochrome b and is mosaic"

Europ. J. Biochem. 94, 451 - 464

Handwerker, A., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F.
(1973)

"Evidence for an extrakaryotic mutation affecting the
maintenance of the rho factor in yeast"

J. Bacteriol. 113, 1307 - 1310

Hartwell, L.H., Hutchinson, H.T., Holland, T.M. and
McLaughlin, C.S. (1969)

"The Effect of Cycloheximide Upon Polyribosome Stability
in Two Yeast Mutants Defective Respectively in the Initiation
of Polypeptide Chains and in Messenger RNA Synthesis"

Mol. Gen. Genet. 106, 347 - 361

Hennig, B., Neher, E.-M., Zimmermann, R. and Neupert, W.
(1980)

"The role of protein transport in the assembly and
organisation of mitochondrial membranes and matrix"
In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"
(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)
Elsevier/North-Holland, im Druck

Hensgens, L.A.M., Grivell, L.A., Borst, P. and Bos, J.L.
(1979)

"Nucleotide sequence of mitochondrial structural gene for
subunit 9 of yeast ATPase complex"
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1663 - 1667

Hinkle, D.C. and Chamberlin, M.J. (1972)

"Studies of the binding of Escherichia coli RNA poly-
merase to DNA. I. The role of sigma subunit in site selection"
J. Mol. Biol. 70, 157 - 185

Holzer, H. (1976)

"Catabolite Inactivation in Yeast"
Trends. Biochem. Sci. 1, 178 - 180

Hutchinson, H.T., Hartwell, L.H. and McLaughlin, C.S.
(1969)

"Temperature - sensitive Yeast Mutant Defective in
Ribonucleic Acid Production"
J. Bacteriol. 99, 807 - 814

Ibrahim, N.G., Stuchell, R.N. and Beattie, D.S. (1973)

"Formation of the yeast mitochondrial membrane
2. Effects of glucose repression on mitochondrial
protein synthesis"
Europ. J. Biochem. 36, 519 - 527

Jacob, F. and Monod, J. (1961)

"Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins"
J. Mol. Biol. 3, 318 - 356

- Jacq, C., Lazowska, J. and Slonimski, P.P. (1980)
"Sur un nouveau mécanisme de régulation de l'expression
génétique"
Comptes rendus Acad. Sci. Paris 290 (accepted for publication)
- Jayaraman, J., Cotman, C., Mahler, H.R. and Sharp. C.W.
(1966)
"Biochemical Correlates of Respiratory Deficiency. VII.
Glucose Repression"
Arch. Biochem. Biophys. 116, 224 - 251
- Jayaraman, J., Padmanaban, G., Malathi, K. and Sarma, P.S.
(1971)
"Haem synthesis during mitochondriogenesis in yeast"
Biochem. J. 121, 531 - 535
- Jones, O.W. and Berg, P. (1966)
"Studies on the Binding of RNA Polymerase to Polynucleotides"
J. Mol. Biol. 22, 199 - 209
- Kalnov, S.L., Novikova, L.A., Zubatov, A.S. and
Luzikow, V.N. (1979)
"Participation of a mitochondrial proteinase in the break-
down of mitochondrial translation products in yeast"
FEBS Lett. 101, 355 - 357
- Kaukel, E., Mundhenk, K. and Hilz, H. (1972)
" N^6 -Monobutyryladenosine 3':5'-Monophosphate as the
biologically active derivate of dibutyryladenosine 3':5'-
monophosphate in HeLa s 3 cells"
Europ. J. Biochem. 27, 197 - 200
- Laemmli, U.K. (1970)
"Cleavage of structural proteins during the assembly of
the head of bacteriophage t-4"
Nature 227, 680 - 685

Lee, C.-Y. and Kaplan, N.O. (1975)

"Characteristics of 8 - substituted adenine nucleotide
derivates utilized in affinity chromatography"

Arch. Biochem. Biophys. 168, 665 - 676

Levens, D., Lustig, A., Ticho, B., Synenki, R.,
Merten, S., Locker, J. and Rabinowitz, M. (1980)

"Transcription and processing of mtDNA"

In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"

(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)

Elsevier/North-Holland, im Druck

Lin, L.-F.H., Kim, I.-C. and Beattie, D.S. (1974)

"Formation of the yeast mitochondrial membrane

III. Accumulation of mitochondrial proteins synthesized
in both the cytoplasm and mitochondria in yeast under-
going glucose derepression"

Arch. Biochem. Biophys. 160, 458 - 464

Locker, J., Morimoto, R., Synenki, R.M. and Rabinowitz, M.
(1980)

"Analysis of mitochondrial RNA in *Saccharomyces cerevisiae*"

Current Genetics 1, 163 - 172

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.
(1951)

"Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent"

J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Lustig, A., Levens, D. and Rabinowitz, M. (1980)

"The regulation of mitochondrial derepression in
Saccharomyces cerevisiae"

In: "10th International Conference of Yeast Genetics
and Molecular Biology", Abstract p. 144

- Machleidt, W. and Werner, S. (1980)
"Structural aspects of cytochrome oxidase polypeptides
in *Neurospora crassa*"
In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"
(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)
Elsevier/North-Holland, im Druck
- Macino, G. and Tzagoloff, A. (1979)
"Partial sequence of a mitochondrial ATPase gene in
Saccharomyces cerevisiae"
Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 131 - 135
- Mahler, H.R. and Lin, C.C. (1974)
"The derepression of δ -aminolevulinate synthetase in yeast"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 963 - 970
- Mahler, H.R. and Lin, C.C. (1978)
"Exogenous Adenosine 3':5' - Monophosphate can release
yeast from catabolite repression"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1039 - 1047
- Majors, J. (1975)
"Specific binding of CAP factor to lac promoter DNA"
Nature (London) 256, 672 - 674
- Makman, R.S. and Sutherland, E.Q. (1965)
"Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*"
J. Biol. Chem. 240, 1309 - 1314
- McKnight, G.S. (1977)
"A colorimetric method for the determination of sub-
microgram quantities of protein"
Analyt. Biochem. 78, 86 - 92

- Moorman, A.F.M., Lamie, F. and Grivell, L.A. (1976)
"A coupled transcription - translation system derived
from Escherichia coli: The use of immobilized deoxy-
ribonuclease to eliminate endogenous DNA"
FEBS Lett. 71, 67 - 72
- Moorman, A.F.M., Grivell, L.A., Lamie, F. and Smits, H.L.
(1978)
"Identification of mitochondrial gene products by DNA-
directed protein synthesis in vitro"
Biochem. Biophys. Acta 518, 351 - 365
- Morimoto, R., Lewin, A., Hsu, H.-J., Rabinowitz, M. and
Fukuhara, H. (1975)
"Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA
from grande and genetically characterized cytoplasmic
petite clones of Saccharomyces cerevisiae"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3868 - 3872
- Nissley, S.P., Anderson, W.B., Gallo, M., Pastan, I. and
Perlman, R.L. (1972)
"The binding of cyclic adenosine monophosphate receptor
to deoxyribonucleic acid"
J. Biol. Chem. 247, 4265 - 4269
- Duchterlony, Ö. (1965)
"Gel-Diffusion techniques"
In: Immunchemie (15. Colloquium der Gesellschaft für
Physiologische Chemie) pp. 13 - 35
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Pastan, I. and Adhya, S. (1976)
"Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate in Escherichia coli"
Bacteriol. Rev. 40, 527 - 551

- Perlman, P.S. and Mahler, H.R. (1974)
"Derepression of Mitochondria and Their Enzymes in Yeast: Regulatory Aspects"
Arch. Biochem. Biophys. 162, 248 - 271
- Perlman, R.L. and Pastan, I. (1968)
"Cyclic 3',5'- AMP: stimulation of β -galactosidase and tryptophanase induction in *E. coli*"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 656 - 664
- Polakis, E.S., Bartley, W. and Meek, G.A. (1965)
"Changes in the Activity of Respiratory Enzymes during the Aerobic Growth of Yeast on Different Carbon Sources"
Biochem. J. 97, 298 - 302
- Pomerantz, A.H., Rudolph, S.A., Haley, B.E. and Greengard, P. (1975)
"Photoaffinity Labeling of a Protein Kinase from Bovine Brain with 8 - Azidoadenosine 3',5'- Monophosphate"
Biochemistry 14, 3858 - 3862
- Poulson, R. and Polglase W.J. (1974)
"Site of glucose repression of heme biosynthesis"
FEBS Lett. 40, 258 - 260
- Poyton, R.O. and Schatz, G. (1975)
"Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast III. Physical characterization of isolated subunits and chemical evidence for two different classes of polypeptides"
J. Biol. Chem. 250, 752 - 761
- Poyton, R.O. and Kavanagh, J. (1976)
"Regulation of mitochondrial protein synthesis by cytoplasmic proteins"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3947 - 3951
- Puglisi, P.P. and Algeri, A. (1971)
"Role of the Mitochondrion in the Regulation of Protein Synthesis in the Eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*"
Molec. Gen. Genet. 110, 110 - 117

Riggs, A.D., Reiness, G. and Zubay, G. (1971)

"Purification and DNA-binding properties of the catabolite gene activator protein"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1222 - 1225

Rödel, G. (1977, a)

"Untersuchung über die DNA-bindenden Eigenschaften mitochondrial synthetisierter Proteine bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*"

Diplomarbeit, München

Rödel, G. and Bandlow, W. (1977, b)

"DNA - Binding Properties of Mitochondrially Synthesized Proteins"

In: Mitochondria 1977, Genetics and Biogenesis of Mitochondria pp. 503 - 509

(Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., eds)
De Gruyter, Berlin

Rouslin, W. (1976)

"Catabolite Repression of the Formation of Precursors of Electron Transfer Complexes III and IV in Adapting Bakers' Yeast: Dependence upon a Mitochondrially Translated Repressor"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 364 - 369

Rozijn, T.H. and Tonino, G.J.M. (1964)

"Studies on the Yeast Nucleus"

Biochem. Biophys. Acta 91, 105 - 112

Rubin, G.M. (1975)

"Preparation of RNA and Ribosomes from Yeast"

In: Methods of Cell Biology, Vol XII (Prescott, D.M. ed)
pp. 45 - 64

Academic Press, New York

- Saltzgaber-Müller, J. and Schatz, G. (1978)
"Heme is Necessary for the Accumulation and Assembly
of Cytochrome c Oxidase Subunits in *Saccharomyces cerevisiae*"
J. Biol. Chem. 253, 305 - 310
- Sanders, H.K., Mied, P.A., Briquet, M. Hernandez-Rodriguez, J.,
Gottal, R.F. and Mattoon, J.R. (1973)
"Regulation of Mitochondrial Biogenesis: Yeast Mutants
Deficient in Synthesis of δ -Aminolevulinic Acid"
J. Mol. Biol. 80, 17 - 39
- Scatchard, G. (1949)
"The attraction of proteins for small molecules and ions."
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672
- Schatz, G. (1980)
"Interaction between the nuclear and mitochondrial genomes"
In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"
(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)
Elsevier/North-Holland, im Druck
- Schatz, G. and Mason, T.L. (1974)
"The Biosynthesis of Mitochondrial Proteins"
Annu. Rev. Biochem. 43, 51 - 87
- Schatz, G. and Kováč, L. (1974)
"Isolation of promitochondria from anaerobically grown
Saccharomyces cerevisiae"
In: "Methods of Enzymology Vol. XXXI
(Fleischer, S. and Packer, L., eds) pp. 627 - 632
- Schlenderer, G. and Dellweg, H. (1974).
"Cyclic AMP and Catabolite Repression in Yeasts"
Eur. J. Biochem. 49, 305 - 316

Schmitt, E. (1980)

"Glukose - Katabolitrepression bei *Saccharomyces cerevisiae*:
Isolierung, genetische und biochemische Charakterisierung
konstitutiv dereprimierter (*ccr*⁻) Mutanten"

Dissertation, München

Schwab, A.J., Sebald, W. and Weiss, H. (1972)

"Different pool sizes of the precursor polypeptides of
cytochrom oxidase from *Neurospora crassa*"

Europ. J. Biochem. 30, 511-516

Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1970)

"Proteinsynthesis by Yeast mitochondria in vivo. Quantita-
tive estimate of mitochondrially governed synthesis of
mitochondrial proteins"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 728 - 735

Scragg, A.H. (1976)

"Origin of the mitochondrial RNS polymerase of yeast"

FEBS Lett. 65, 148 - 151

Siebenlist, U., Simpson, R.B. and Gilbert, W. (1980)

"E. coli RNA Polymerase interacts homologously with two
different promoters"

Cell 20, 269 - 281

Sisler, H.D. and Siegel, M.R. (1967)

"Cycloheximide and other glutarimide antibiotics"

In: "Antibiotics, mechanism of action"

(Gottlieb, D. and Shaw, P.D., eds) pp. 283 - 307

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

South, D.J. and Mahler, H.R. (1968)

"RNA synthesis in yeast mitochondria: a derepressible
activity"

Nature 218, 1226 - 1232

Studier, F.W. (1973)

"Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels"

J. Mol. Biol. 79, 237 - 248

Sutcliffe, J.G. (1978)

"pBR 322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long"

Nuc. Acids Res. 5, 2721 - 2728

Sy, J. and Richter, D. (1972, a)

"Separation of a cyclic 3',5' - Adenosine Monophosphate binding protein from yeast"

Biochemistry 11, 2784 - 2787

Sy, J. and Richter, D. (1972, b)

"Content of Cyclic 3',5' - Adenosine Monophosphate and Adenylyl Cyclase in Yeast at Various Growth Conditions"

Biochemistry 11, 2788 - 2791

Thalenfeld, B.E. and Tzagoloff, A. (1980)

"Assembly of the mitochondrial membrane system.

Sequence of the oxi 2 gene of yeast mitochondrial DNA"

J. Biol. Chem. 255, 6173 - 6180

Thorell, J.I. and Johansson, B.G. (1971)

"Enzymatic Iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity"

Biochem. Biophys. Acta 251, 363 - 369

Tzagoloff, A., Rubin, M.S. and Sierra, M.F. (1973)

"Biosynthesis of mitochondrial enzymes"

Biochem. Biophys. Acta 301, 71 - 104

Tzagoloff, A., Akai, A. and Needleman, R.B. (1975)

"Assembly of the mitochondrial membrane system. Isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions"

J. Bact. 122, 826 - 831

Tzagoloff, A., Macino, G. and Sebald, W. (1979)

"Mitochondrial Genes and Translation Products"

Ann. Rev. Biochem. 48, 419 - 441

Van't Sant, P., Mak, J.F.C. and Kroon, A.M. (1980)

"Regulation of the synthesis of mitochondrial proteins:
is there a repressor?"

In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"

(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)

Elsevier/North-Holland, im Druck

Van Wijk, R. and Konijn, T.M. (1971)

"Cyclic 3',5'-AMP in *Saccharomyces carlsbergensis* under
various conditions of catabolite repression"

FEBS Lett. 13, 184 - 186

Walter, U. Uno, I., Liu, A.Y.-C. and Greengard, P. (1977)

"Identification, Characterization, and Quantitative
Measurement of Cyclic AMP Receptor Proteins in Cytosol
of Various Tissues Using a Photoaffinity Ligand"

J. Biol. Chem. 252, 6494 - 6500

Walton, G.M. and Garren, L.D. (1970)

"An Assay for Adenosine 3',5' - cyclic monophosphate
based on the association of the nucleotide with a partially
purified binding protein"

Biochemistry 9, 4223 - 4229

Werner, S., Machleidt, W., Bertrand, H. and Wild, G.
(1980)

"Assembly and structure of cytochrome oxidase in *Neurospora
crassa*"

In: "The Organization and Expression of the Mitochondrial
Genome"

(Kroon, A.M. and Saccone, C., eds)

Elsevier/North-Holland, im Druck

Wintersberger, U. (1974)

"Absence of a Low-Molecular-Weight DNA Polymerase from Nuclei of the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*"

Europ. J. Biochem. 50, 197 - 202

Zennaro, E., Falcone, C., Frontali, L. and Puglisi, P.P. (1977)

"Dependence of Cytoplasmic on Mitochondrial Protein Synthesis in *K.lactis* CBS 2360"

Molec. Gen. Genet. 150, 137 - 140

Zitomer, R.S., Montgomery, D.L., Nichols, D.L. and Hall, B.D. (1979)

"Transcriptional Regulation of the Yeast Cytochrome c gene"

Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 3627 - 3631

Danksagung

Am Ende der Arbeit möchte ich allen Mitarbeitern des Genetischen Institutes danken, die an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Dr. W. Bandlow für die Aufgabenstellung und Betreuung der Arbeit
- Frau U. Baumann für hervorragende Assistenz
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Arbeit größtenteils finanzierte

Lebenslauf

1952	geboren am 31.7. in Augsburg
1958 - 1962	Volksschule in Augsburg
1962 - 1971	Besuch des Peutingergymnasiums in Augsburg
1971	Abitur
1971 - 1976	Studium der Biologie an der Universität München
1976 - 1977	Diplomarbeit am Genetischen Institut der Universität München; Studienabschluß mit Diplom in Biologie
1977	Beginn der Dissertationsarbeit bei Priv. Doz. Dr. Bandlow
1979	Eheschließung mit Gabriele Christ Geburt unseres Sohnes Jan Nicolas

